

**ENVOLVIMENTO DA RESPOSTA AO ESTRESSE DO RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO NAS SEQUELAS NEUROLÓGICAS
DESENCADEADAS PELA SEPSE**

Luciana de Souza Afonso

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE NOVA IGUAÇU

2018

**ENVOLVIMENTO DA RESPOSTA AO ESTRESSE DO RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO NAS SEQUELAS NEUROLÓGICAS
DESENCADEADAS PELA SEPSE**

Luciana de Souza Afonso

Monografia apresentada como atividade obrigatória à integralização de créditos para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas - Modalidade EAD.

Orientador (a): Dr. Julia Helena Rosauo Clarke

Co-Orientadora: Mestranda Virgínia Luiz de Sousa

Orientadora: Dr. Julia Helena Rosauo Clarke

Co-Orientadora: Mestranda Virgínia Luiz de Sousa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

PÓLO UNIVERSITÁRIO DE NOVA IGUAÇU

2018

II

FICHA CATALOGRÁFICA

Afonso, Luciana de Souza

Envolvimento da resposta ao estresse do retículo endoplasmático nas sequelas neurológicas desencadeadas pela sepse. Nova Iguaçu, 2018. 59 f. il: 31 cm

Orientadora: Dr. Julia Helena Rosauo Clarke

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Licenciado (a) no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD. Ano 2018

Referências bibliográficas: f.38-46

1.Sepse, Encefalopatia associada a sepse, Estresse do Retículo endoplasmático, Peptídeos beta amilóides

I. CLARKE, Julia Helena Rosauo

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD

III. Envolvimento da resposta ao estresse do retículo endoplasmático nas sequelas neurológicas desencadeadas pela sepse



UNIVERSIDADE
DO BRASIL
UFRJ



instituto de **biologia**
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ATA - DEFESA DE MONOGRAFIA DE PROJETO FINAL		
NOME DO GRADUANDO (A) Luciana De Souza Afonso		MATRÍCULA 12214020045
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB – UFRJ – EAD – POLO: Nova Iguaçu		
TÍTULO DA MONOGRAFIA "Envolvimento da resposta ao estresse do retículo endoplasmático nas sequelas neurológicas desencadeadas pela sepse"		
NOME DOS MEMBROS DA BANCA	TÍTULO	ASSINATURA
Orientadora: Julia Helena Rosauo Clarke	Doutor	<i>Julia HR Clarke</i>
Bianca dos Santos Carvalho	CEDERJ	<i>Bianca dos Santos Carvalho</i>
Cynthia Pecli e Silva	Doutor	<i>Cynthia Pecli e Silva</i>
Data: 28/11/2018		
<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO (A)		<input type="checkbox"/> REPROVADO (A)
HAVENDO SUGESTÕES NA DEFESA, COLOCAR TÍTULO MODIFICADO DA MONOGRAFIA		
Sr.(a) Coordenador (a): encaminho, em anexo, a versão <u>revisada</u> do Trabalho Final de Curso nos formatos <u>impresso</u> e <u>digital</u> . Atesto que tal versão contempla as sugestões e/ou observações feitas pela banca durante a defesa.		
ORIENTADOR: <i>Julia HR Clarke</i>		
LOCAL E DATA: Salão azul, Bloco A- CCS- UFRJ – 28/11/2018		
COORDENADOR DO CURSO		
LOCAL E DATA: Salão azul, Bloco A- CCS- UFRJ – 28/11/2018		

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Criador de tudo, Deus. Inúmeros foram os desafios para alcançar o Ensino Superior, quando não se tratava das questões materiais, falavam alto as morais, que promoviam sempre a superação. Por vezes parecia estar sozinha, por vezes pensei estar desamparada com minha pequena mentalidade; demorou, mas percebi que nada na vida ocorre por acaso e se as provas da vida me apareciam, era para testar-me se a lição fora bem apreendida. Nem sempre as notas nessa grande escola foram e são as melhores, no entanto, o Mestre de todos os mestres, Jesus, manteve sua eterna paciência, bondade e doçura e me ensinou a refazer as lições, permitindo que Irmãos invisíveis me acompanhassem afim de fortalecer-me o equilíbrio, a alegria, doçura e a paz, elementos indispensáveis para todos os nossos dias.

Agradeço aos queridos familiares que contribuíram, cada um a sua maneira, para realização de meus sonhos que tornaram-se deles também. Minha querida mãe e pai (em memória) que ajudaram-me através de todos os meios possíveis e o mais importante: me concederam a vida! Eternamente grata; Irmãos ajudaram-me a vencer meus medos, que nada de bom é conquistado sem perseverança e bom ânimo; Querida cunhada Daiane inúmeras vezes me ouviu, me ajudou na coleta de materiais para aulas práticas me acolheu; Os primos queridos e tios vibraram diante das conquistas e se aventuraram nos aprendizados. As sobrinhas e sobrinho nos quais tornaram toda a aprendizagem do ensino superior mais significativa por observar a maneira na qual aprendiam e isso só fez aumentar o interesse pelo processo de ensino/aprendizagem.

Agradeço ao namorado, amigo, e cúmplice Victor Luiz. Por vezes manteve-se em segundo plano para meu crescimento moral e intelectual. Me ajudou com as disciplinas que tinha dificuldade, esteve comigo na conquista de meus sonhos, encheu-me de sorrisos quando meu rosto estava em lágrimas por razões múltiplas, aconselhou-me, sempre me ajudando a enxergar minhas potencialidades. Os dias que ficávamos afastados por conta dos estudos, era como se uma parcela de luz fora retirada. Nesses momentos os ânimos eram limitados. Mas quando estávamos e estamos juntos, tudo apresenta nova cor, novo brilho, novas soluções. Vivemos, crescemos, aprendemos e aprenderemos juntos, pois o que nos uni, vai muito além das estrelas. A Universidade Federal do Rio de Janeiro ofereceu-me o presente do conhecimento e do amor sutil, com ele. Eternamente grata a você, meu príncipe.

Agradeço aos amigos por terem tornado as situações mais divertidas e leves, colaborando com seus conhecimentos e me ensinando ainda mais. Na dúvida do preparo de substâncias e

apresentações, tinham os que pacientemente ensinavam, ouviam e sugeriam com bondade; No acúmulo de preocupações, tinham os que compreendiam , aconselhavam e se necessário, repreendiam as falhas para meu próprio crescimento, já que as verdades são necessárias e devem sempre ser ditas .

Agradeço a Robson Costa, Cláudia Figueiredo, Julia Clarke, Daiane Oliveira, Virgínia Sousa e Suzana Araújo, que promoveram a leveza do desenvolvimento do projeto e a alegria nestes anos de Iniciação científica, com os normais desafios também. Me acolheram, me deram a oportunidade de estar junto em todos os momentos. Compreenderam minhas limitações, fazendo delas degraus para aquisição de meus objetivos. E precisei superar-me ainda mais. Impossível esquecer-me dos professores Leandro Macedo, Bianca Carvalho, Maulori Cabral, Izabel Liberto, Paula F.de Sá, Sérgio Guedes e Alessandra Chacon, que são espelhos para minha futura atuação no magistério. Pessoas de bom coração que estiveram e estão sempre dispostas a ensinar-me o legado do carinho e bom humor no processo do ensino/aprendizado. Que seus corações se preservem assim e aperfeiçoem-se para tocar a muitos outros corações como se deu com o meu.

Obrigada à todos!

"A sua vida será sempre o que esteja mentalizando constantemente.

Em razão disso, qualquer mudança real em seus caminhos,
virá unicamente da mudança de seus pensamentos".

André Luiz

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. SEPSE	1
1.2. ENCEFALOPATIA ASSOCIADA A SEPSE (EAS).....	3
1.3. EAS E A DOENÇA DE ALZHEIMER	6
1.4. RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	9
1.4.1. O CONTROLE DA SÍNTESE E DEGRADAÇÃO PROTEICA	9
1.4.2. ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.....	10
1.4.2.1. MECANISMO DE DEGRADAÇÃO ASSOCIADO AO RE (ERAD).....	11
1.4.2.2. ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (ERE) E RESPOSTA A PROTEÍNAS NÃO ENOVELADAS (UPR).....	12
2. OBJETIVO.....	18
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. MODELO ANIMAL.....	19
3.2. INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV).....	21
3.3. EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS.....	21
3.3.1.CAMPO ABERTO.....	21
3.3.2.RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	22
3.3.3. STEP-DOWN.....	23
3.4. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA, SEGUIDA DE REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (RT- PCR).....	243.4.
1. PREPARO DAS AMOSTRAS DE HIPOCAMPO.....	24
3.4.2. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DO TECIDO E QUANTIFICAÇÃO.....	25
3.4.3. SÍNTESE DO RNA COMPLEMENTAR.....	25
3.4.4. RT-PCR.....	25
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO ANIMAL DE SEPSE ATRAVÉS DA LIGAÇÃO E PERFURAÇÃO DO CECO. MORTALIDADE E PARÂMETROS CLÍNICOS.....	27
4.1.1. MORTALIDADE.....	27

4.1.2. PARÂMETROS CLÍNICOS.....	28
4.2. EFEITOS DE UM INSULTO COM UMA DOSE NÃO TÓXICA DE OLIGÔMEROS DE BETA-AMILÓIDE EM CAMUNDONGOS SOBREVIVENTES DA SEPSE SOBRE OS PARÂMETROS LOCOMOTORES E COGNITIVOS	28
4.2.1.PARÂMETROS LOCOMOTORES	28
4.2.2. MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE CURTO PRAZO	29
4.2.3. MEMÓRIA DE MEDO	30
4.3. RT-PCR DO HIPOCAMPO	31
4.3.1. ANÁLISE DOS NÍVEIS DO GENE TNF-α	31
4.3.2. ANÁLISE DOS NÍVEIS DO GENE ATF-4	32
4.3.3. ANÁLISE DOS NÍVEIS DO GENE CHOP	33
4.3.4. ANÁLISE DOS NÍVEIS DO GENE XBP1.....	33
5.DISSCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:Esquema representativo da evolução da sepse com disfunção de órgãos a partir de uma Bactéria.....	2
Figura 2: Esquema representativo do Mecanismo de Encefalopatia associada a sepse.....	4
Figura 3: Ilustração de um neurônio de um paciente saudável e de um paciente com doença de Alzheimer	8
Figura 4: Cascata de sinalização adaptativa da UPR.....	14
Figura 5: Ordem cronológica das respostas adaptativas daUPR	16
Figura 6: Estágios da cirurgia CLP.....	20
Figura 7:Ilustração doAparato do campo aberto.....	22
Figura 8: Ilustração do Teste de reconhecimento de objetos.....	23
Figura 9: Ilustração do aparelho para teste Esquiva inibitória	24
Figura 10: Gráficode Mortalidade.....	27
Figura 11:Gráfico do Teste de Campo aberto.....	29
Figura 12: Gráfico do Teste Reconhecimento de objetos.....	30
Figura 13: Gráfico do Teste Step-Down.....	31
Figura 14: Gráfico representativo do conteúdo do gene TNF- α	32
Figura 15: Gráfico representativo do conteúdo do gene ATF-4.....	33

Figura 16: Gráfico representativo do conteúdo do gene CHOP.....33

Figura 17: Gráfico representativo do conteúdo do gene XBP1.....34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATF4: Proteína de Ativação do Fator de Transcrição 4

ABO: Oligômeros de beta-amilóide

A β : Proteína β -amiloide

BASES : *Brazilian Sepsis Epidemiological Study*

BHE : Barreira hematoencefálica

CECAL: Centro de Criação de Animais de Laboratório

CEDERJ: Centro de Educação a Distância do Estado do Rio de Janeiro

CLP: Ligação e perfuração do ceco

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CHOP: Proteína homóloga de ligação C/EBP

DA: Doença de Alzheimer

EAS: Encefalopatia associada a sepse

ERE: Estresse do retículo endoplasmático

ICV: Intracerebroventricular

IL-1: Interleucina-1

LPS: Lipopolissacarídeo

NO: Óxido nítrico

RE: Retículo Endoplasmático

SNC: Sistema Nervoso Central

TLRs: Receptores Toll-like

TNF α : Fator de Necrose Tumoral alfa

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

UTI : Unidades de Terapia Intensiva

UPR: Resposta protéica desdobrada

XBP1: Proteína de ligação a X-box1

RESUMO

A sepse consiste numa resposta exacerbada a uma infecção que afeta milhões de indivíduos. Os sobreviventes à sepse apresentam sequelas cognitivas tardias que podem persistir por toda vida, sendo denominada encefalopatia associada a sepse (EAS), no qual os mecanismos fisiopatológicos do prejuízo cognitivo tardio são desconhecidos, mas clinicamente se assemelham ao prejuízo cognitivo observado nos pacientes com doença de Alzheimer (DA), sugerindo que alguns mecanismos possam ser similares em ambas as demências. Os pacientes com DA apresentam deposição do peptídeo beta amiloide (A β) e estudos descrevem o acúmulo destes peptídeos em camundongos submetidos ao modelo de sepse. A grande maioria das proteínas que uma célula segrega ou exhibe em sua superfície são produzidas no retículo endoplasmático (RE), e qualquer distúrbio nesse sistema pode contribuir para a agregação de proteínas mal enoveladas. Sob estresse, o RE dispara uma via de sinalização conhecida como resposta a proteínas mal enoveladas (UPR) objetivando corrigir qualquer falha no processo de síntese. Muitas doenças neurodegenerativas apresentam um nível elevado de UPR que culmina em acúmulo de A β cerebral. O objetivo deste trabalho foi identificar uma correlação entre a UPR gerada pelo estresse do RE e a encefalopatia causada pela sepse. Para isso usamos o modelo animal de ligação e perfuração do ceco (CLP) em camundongos *Swiss* para induzir a sepse e modelar o prejuízo cognitivo. Observamos que 30 dias após indução da sepse os animais ainda apresentam prejuízo cognitivo e que este prejuízo é revertido 45 dias após a indução da sepse. Por técnica de PCR em tempo real (RT-PCR), utilizamos o cDNA oriundo do hipocampo dos animais do grupo controle (Sham) e dos animais submetidos ao modelo de sepse para avaliação dos níveis de RNA de genes envolvidos na UPR desencadeada pelo estresse retículo endoplasmático, entre eles a proteína homóloga de ligação C/EBP(CHOP), gene TNF- α , ativador do fator de transcrição 4 (ATF4) e proteína de ligação a X-box1 (XBP1). Desta forma, pretendemos contribuir para entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na encefalopatia pós-séptica e identificar novos alvos preventivos e/ou terapêuticos para essa devastadora doença que atinge milhões de indivíduos.

Palavras-chave: Sepse, Encefalopatia associada a sepse, Estresse do Retículo endoplasmático, Peptídeos beta amilóides

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sepses

A sepsis consiste numa resposta inflamatória exacerbada; é uma grave síndrome clínica em que uma resposta inflamatória de todo o sistema tenta eliminar os patógenos (WIDMANN & HENEKA, 2014). A infecção não se encontra em todo o organismo, mas localizada em um ou alguns órgãos, respondendo com uma inflamação a fim de combater o agente estranho ao corpo, comprometendo órgãos distintos do paciente. Basicamente, qualquer micróbio pode causar sepsis (bactéria, vírus, fungos, protozoários), porém as bactérias são os agentes etiológicos mais comuns (BONGARD & SUE, 1994). Com excessiva produção de mediadores inflamatórios e ativação de células inflamatórias em tal síndrome, “o próprio organismo não consegue controlar o que ele próprio criou” (BONE, 1991). Os mecanismos de defesa envolvidos são muito mais complexos daqueles apresentados neste trabalho e consistem em uma vasta gama de respostas promovidas pelo sistema imune na tentativa de combater o patógeno. Mas de forma resumida, temos que primeiramente o hospedeiro defende-se por células fagocitárias (macrófagos, monócitos e granulócitos polimorfonucleares) e pela via alternativa do complemento, cuja ação é não específica. Em seguida, as células imunocompetentes e as imunoglobulinas iniciam uma resposta imune específica (BONE, 1991; RÉA, 1996; VINCENT *et al.*, 1996). Os principais ativadores da resposta inflamatória são os componentes da parede bacteriana, que são o ácido teicóico dos microorganismos Gram-positivos e as endotoxinas dos microorganismos Gram-negativos (principalmente o lipídio A). Tais componentes levam à eclosão de uma cascata inflamatória, sendo liberados no início a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), promovendo a estimulação vigorosa da resposta celular, com liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de granulócitos (VINCENT *et al.*, 1996; THIJIS & HACK, 1995). Esses mediadores secundários serão os responsáveis pela reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória, formando um ciclo inflamatório vicioso (BONE, 1991; PARRILO, 1993). Diante destes mecanismos, as manifestações clínicas estão associadas ao foco infeccioso em questão. O diagnóstico é limitado, já que os sinais de resposta inflamatória podem estar presentes

em outras situações. São vários sintomas que marcam essa condição clínica, entre eles, a taquicardia ou bradicardia, hipotensão, dispnéia, taquipnéia, edema periférico, confusão e redução do nível de consciência (VIANA, MACHADO & SOUZA, 2017). Assim, os pacientes podem apresentar falência de órgãos e com consequência de uma evolução para o óbito (Figura 1).

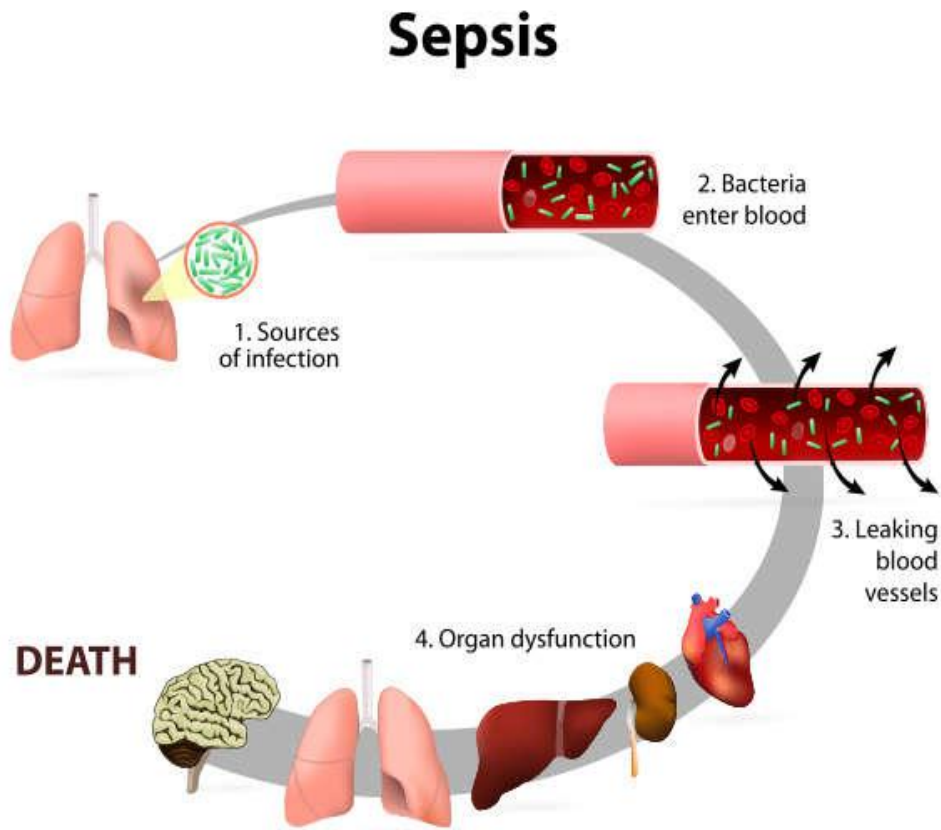


Figura 1: Evolução da Sepsis com disfunção de órgãos a partir de uma Bactéria. Fonte: Bel Marra Health.

A sepsis é uma das principais causas de mortalidade de pacientes que se encontram nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI), representando 10% - 50% de mortes. No Brasil, dados epidemiológicos do Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES) avaliou 1.383 pacientes internados em cinco unidades de terapia intensiva nas regiões sudeste e sul por um período de cinco meses (SILVA *et al.*, 2004). Do total de 1.383 pacientes incluídos, 415 pacientes (30,5%) desenvolveram sepsis, 241 (17,4%) sepsis grave e 203 (14,7%) choque séptico. A taxa de mortalidade encontrada foi de

33,9%, 46,9% e 52,2%, para sepse, sepse grave e choque séptico, respectivamente. Em outro estudo, que foi realizado em 75 UTIs de todas as regiões brasileiras com tempo médio de internação de 15 dias, foram identificados 3.128 pacientes e 521 (16,7%) foram diagnosticados como tendo o diagnóstico de sepse, sepse grave ou choque séptico. A mortalidade na sepse, sepse grave e choque séptico foram de 16,7%, 34,4% e 65,3%, respectivamente, cuja as duas principais fontes de infecção foram no trato respiratório (69%) e no abdômen (23,1%). Os bacilos gram-negativos foram mais prevalentes (40,1%). Os cocos gram-positivos foram identificados em 32,8% e as infecções fúngicas em 5% (JUNIOR *et al.*, 2006). Daqueles que conseguem sobreviver a tais respostas imunológicas tão intensas, encontram-se os que apresentam sequelas não duradouras, sem levar a grandes modificações em suas vidas, e há aqueles com consequências como imunossupressão, comprometimento renal, pré-disposição à câncer, e gravidades neurodegenerativas, podendo resultar na encefalopatia associada à sepse.

1.2. Encefalopatia associada à sepse (EAS)

Com o progresso da sepse, o sistema nervoso central (SNC) é agredido, tendo estudos sugerido um possível rompimento da barreira hematoencefálica (BHE) permitindo a passagem de citocinas e toxinas, levando a um quadro de neuroinflamação que pode progredir para um estado patológico denominado encefalopatia associada a sepse (EAS), cujos mecanismos exatos envolvidos ainda não são bem compreendidos, mas se caracteriza por prejuízos cognitivos e distúrbios comportamentais (DAL, 2009; BIFF *et al.*, 2013). A EAS é considerada clinicamente reversível, contudo, diversos estudos têm sugerido que um grande número de sobreviventes da sepse apresentam prejuízos cognitivos irreversíveis, causando sequelas neurológicas tardias que podem permanecer ao longo da vida (IWASHYNA *et al.*, 2010; SEMMLER *et al.*, 2012). O grande desafio encontra-se no fato de encontrar meios para prevenir ou tratar tais sintomas devido à insuficiência de compreensão dos mecanismos que regulamenta tal doença.

Existem várias hipóteses que tentam elucidar a EAS, uma delas pressupõe a ativação do sistema imune inato devido a um componente da parede celular bacteriana, o lipopolissacarídeo (LPS), gerando mediadores inflamatórios, que incluem quimiocinas e óxido nítrico (NO). A ativação dos mediadores inflamatórios provoca um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), permitindo que citocinas atravessem essa barreira e alcancem o SNC. O extravasamento de mediadores inflamatórios, lesão de células endoteliais e a migração de células imunes vão contribuir para iniciar uma reação cerebral diante da persistência da inflamação. Com ativação de microglia, astrócitos e uma invasão de células do sistema imunológico no cérebro, e com a presença de moléculas inflamatórias, causarão disfunção neuronal e possível morte celular (Figura 2).

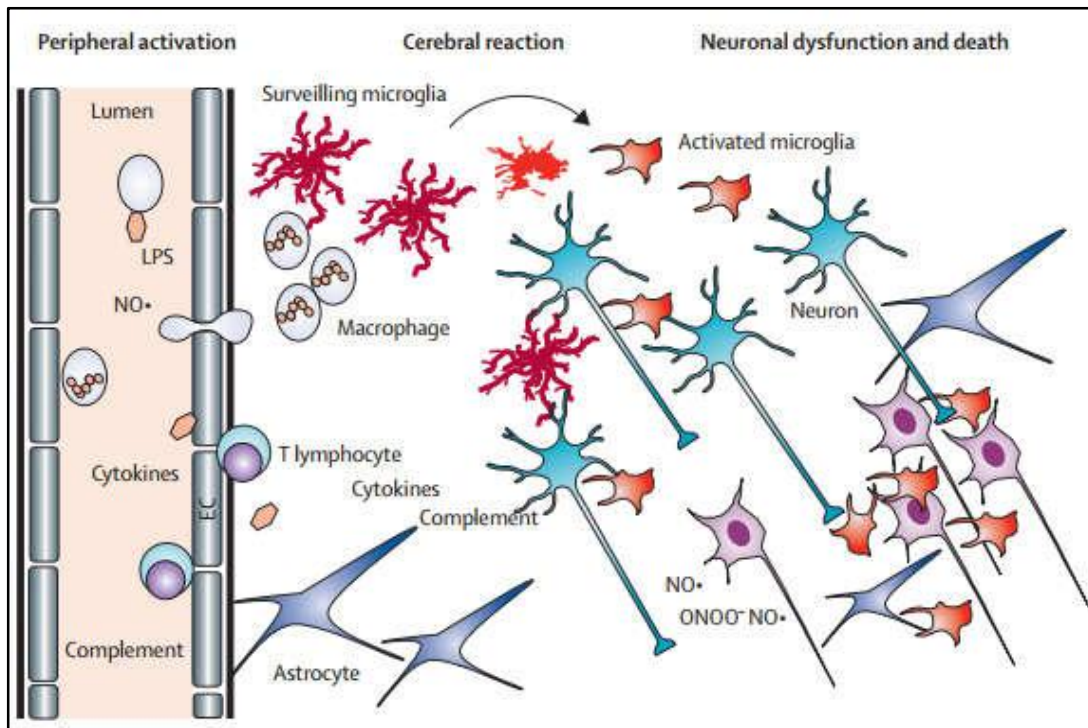


Figura 2: Mecanismo de Encefalopatia associada à sepse. Fonte: WIDMANN, HENEKA 2014

Diversas são as propostas de mecanismos, que inclui disfunção mitocondrial, dano oxidativo, distúrbios de neurotransmissores, neuroinflamação e morte celular (BOZZA *et al.*, 2013), onde a disfunção da BHE é um processo bem descrito na sepse experimental e clínica (DAVIES 2002; WEISS *et al.*, 2009; PIAZZA & COTENA,

2012; POLITO *et al.*, 2013), que se caracteriza por alterações nas *tight junctions* endoteliais e disfunção das unidades gliovasculares, possibilitando a passagem de mediadores inflamatórios e neurotóxicos para o cérebro. Além do acesso de mediadores inflamatórios pela BHE disfuncional, a resposta inflamatória sistêmica se propaga para o SNC por outras vias. Uma das vias é neural, com a ativação do nervo vago aferente (MRAVEC 2010; JANIG & GREEN, 2014). Outra via é a humoral, através dos órgãos circumventriculares e do plexo coróide, destituído de BHE e que apresentam proteínas importantes no reconhecimento de patógenos e receptores para citocinas próinflamatórias. A ativação dos receptores Toll-like (TLRs), que possuem importante função no sistema imune inato por meio do reconhecimento de moléculas conservadas em micróbios, compele a produção e liberação de citocinas no sistema nervoso central (TRACEY, 2002; CZURA & TRACEY, 2005).

Alguns estudos clínicos demonstraram que pacientes que sobreviveram a sepse grave apresentaram comprometimento cognitivo de longo prazo, incluindo alterações na memória, atenção, concentração e/ou prejuízo global da função cognitivo, além de perda de qualidade de vida. Aproximadamente, até 71% dos pacientes sépticos desenvolvem disfunção cerebral aguda irreversível (WIDMANN & HENEKA, 2014; WILSON & YOUNG, 2003). Iwashyna (2010) e colaboradores estudaram o efeito da sepse sobre o declínio cognitivo em um grupo de 27.000 idosos acompanhados por oito anos. Após um episódio de sepse houve um aumento significativo na probabilidade de desenvolvimento de disfunção cognitiva, que persistiu ao longo dos oito anos de acompanhamento. Além disso, o risco de comprometimento cognitivo moderado a grave aumentou em três vezes, de 6,1% para 16,7% (IWASHYNA *et al.*, 2010).

Um dos maiores problemas quanto à determinação da incidência e prevalência da encefalopatia associada à sepse é que não há teste específico ou conjunto de critérios diagnósticos para definir tal condição (NEERA & DUGGAL, 2014). As mudanças geradas diante desta condição são preocupantes, uma vez que o paciente após receber alta hospitalar, leva consigo as sequelas da sepse, o impossibilitando muitas vezes de realizar tarefas cotidianas.

Embora o potencial de consequências significativas seja bem preocupante, visto que afeta o cotidiano de pacientes que se encontram no quadro séptico, estratégias para

evitar o prejuízo cognitivo ou promover uma efetiva recuperação funcional ainda são escassos (KURTZ, 2016).

1.3. EAS e a doença de Alzheimer (DA)

O comprometimento cognitivo que se vê na encefalopatia após a sepse é similar ao da DA nos estágios iniciais (WIDMANN & HENEKA, 2014), apresentando frequentemente déficit de memória e das funções executivas, com especial envolvimento do hipocampo, no qual se encontra gravemente afetado na DA, permitindo inferir uma correlação dos mecanismos presentes nos pacientes que desenvolveram sepse, sobreviveram e apresentaram comprometimento cognitivo tardio com a DA.

Algumas citocinas pró inflamatórias como IL-6, IL-1 β e TNF- α encontram-se aumentadas na EAS e estimulam a produção de NO, estando presentes também no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer (HULL *et al.*, 1996; DICKSON *et al.*, 1993).

A citocina IL-1 β demonstra contribuir para o comprometimento da função cognitiva e diminuição da viabilidade neuronal (RELTON & ROTHWELL, 1992; VEREKER *et al.*, 2001; BALOSSO *et al.*, 2008; POTT-GODOY *et al.*, 2008; VEZZANI *et al.*, 2011) em vários sistemas modelo. Em modelos animais de neurodegeneração crônica, tal ativação inflamatória pode produzir patologia e foi mostrado exacerbar a progressão neurodegenerativa (SHENG & YAO, 2003; KITAZAWA, OKUGAWA & OTA, 2003; LEE *et al.*, 2008; CUNNINGHAM *et al.*, 2009; KRSTIC *et al.*, 2012) .

O TNF α que promove a intensa estimulação no início da resposta celular, por exemplo, presente no desenvolvimento da sepse, tem sido demonstrado em trabalhos que tal molécula quando se faz presente sistemicamente, está associado a sintomas característicos da DA, o que inclui ansiedade e depressão (HOLMES *et al.*, 2011), sendo também associado com menor volume do hipocampo (SUDHEIMER *et al.*, 2014) e com maior chance de alteração cognitiva leve (TARKOWSKI *et al.*, 2003) onde seu aumento pode ter papéis na neurodegeneração.

Vê-se também que nos sobreviventes a sepse, está associada uma desregulação grave da homeostase da glicose e resistência à insulina periférica, sendo que a sinalização da insulina quando interrompida, é uma característica presente na doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas, ocasionando déficits cognitivos nestes transtornos (BERHE *et al.*, 2001). Isso foi constatado num estudo realizado por Figueiredo *et al.* (2016) que utilizou drogas que influenciam na sinalização da via da insulina para verificar se melhorava o comprometimento cognitivo associado à sepse em camundongos CLP tratados com Liraglutida por 10 dias, agonista do receptor de GLP-1 conhecido por regular positivamente as vias desencadeadas pela insulina (RYAN & HARDY, 2011), onde foi visto que a partir do vigésimo dia, resgatava-se o comprometimento cognitivo. .

Outros elementos neuropatológicos relevantes em pacientes de DA são a presença de atrofia cortical difusa, degeneração neurovascular, perdas neuronais e sinápticas envolvendo vários sistemas de neurotransmissão, presença de placas senis extracelulares compostas de agregados filamentosos da proteína β -amilóide ($A\beta$) e massas neurofibrilares intracelulares, formadas principalmente por uma proteína, denominadas Tau (SERRANO *et al.*, 2011). Na DA, a morte neuronal ocorre em concomitância à formação de emaranhados neurofibrilares, formados devido à hiperfosforilação aberrante da proteína Tau e placas amilóides, originadas por agregados hidrofóbicos de peptídeo β -amilóide desdobrado (JUCIANO *et al.*, 2017). Interessantemente, estudos recentes realizados com modelo animal de sepse, constataram o acúmulo de agregados de peptídeo $A\beta$ e da proteína Tau no cérebro dos camundongos sobreviventes da doença, tal como acontece na DA (JUCIANO *et al.*, 2017). Algumas distinções podem ser observadas entre um neurônio saudável e um neurônio característico de um paciente com DA (Figura 3) (FALCO *et al.*, 2015).

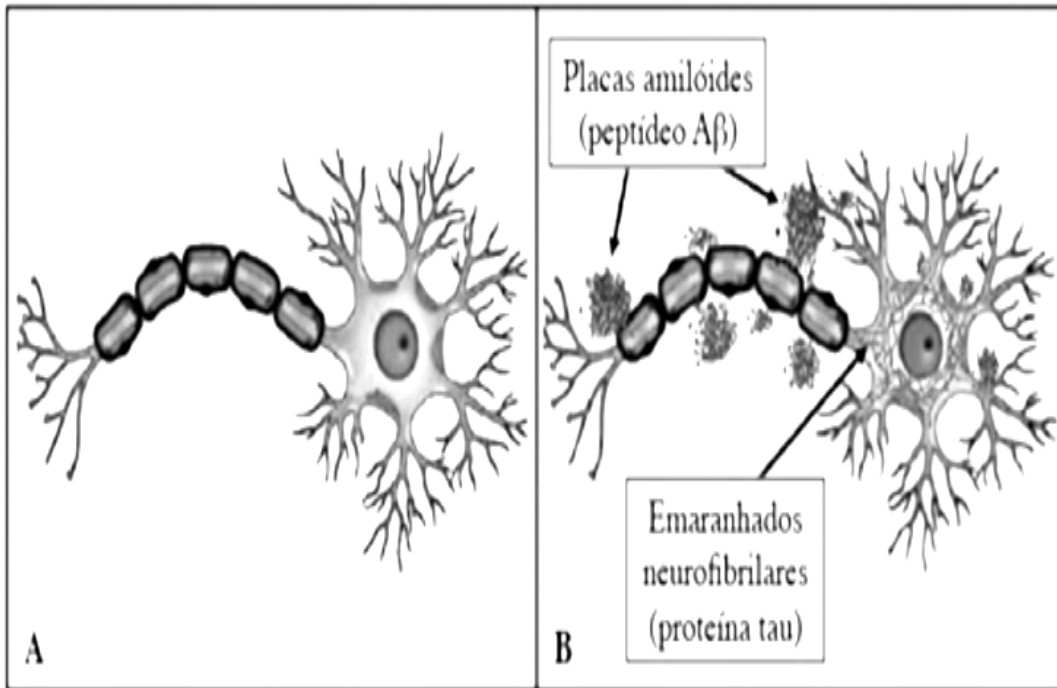


Figura 3: Ilustração de um neurônio de um paciente saudável (A) e, de um paciente com doença de Alzheimer (B). Fonte: FALCO *et al.*, 2015.

Outro evento importante que ocorre na DA é o estresse do retículo endoplasmático (ERE). Acredita-se que o acúmulo de proteínas deformadas esteja envolvido na indução do estresse do RE, resultando em disfunção neuronal e morte celular. Em condições de estresse, as células evitam danos ativando vias de resposta adaptativa conhecidas como resposta protéica desdobrada (UPR) por meio de proteínas associadas à membrana do retículo endoplasmático (SHOKO & SAIDO, 2018). Além da DA várias doenças neurodegenerativas tem como marco patológico o acúmulo de agregados de proteínas ou proteínas mal enoveladas em seus neurônios, e estudos indicam que o ERE tem um papel vital na fisiopatologia dessas doenças (HETZ & SAXENA, 2017). Desta forma torna-se importante um estudo aprofundado sobre a possibilidade do ERE na sepse.

1.4. Retículo endoplasmático

1.4.1. O controle da síntese e degradação protéica

As proteínas são as principais macromoléculas efetoras dos seres vivos. Sua importante função requer que a produção e a degradação proteica sejam cuidadosamente reguladas e sugere que o seu desbalanço possa gerar condições patológicas e, eventualmente, morte celular. Assim, os organismos desenvolveram estratégias bastante conservadas para controlar o metabolismo destas moléculas. Em eucariotos, a síntese proteica envolve a tradução de moléculas de RNA mensageiro produzida no compartimento nuclear a partir de um DNA molde genômico. Esta decodificação é feita no citoplasma por estruturas ribonucleoproteicas conhecidas como ribossomos, que podem estar livres, associados em polirribossomos ou a domínios do retículo endoplasmático (ALAVEZ & LITHGOW, 2012).

Os ribossomos são organelas cuja biogênese e atividade são bastante reguladas por variados fatores protéicos. Isto decorre da necessidade de uma rápida resposta a estímulos externos e também de controle quantitativo e qualitativo do que é traduzido. De fato, a sinalização por hormônios, estressores ou nucleotídeos tem pronto impacto sobre a função ribossomal (KIMBALL & JEFFERSON, 2010). Em um estado inativo, o ribossomo eucariótico permanece em seu estado dissociado, com suas duas subunidades (40S e 60S). O seu acoplamento e a consequente ativação resultam da interação entre a subunidade menor, o RNA mensageiro a ser traduzido e diversos fatores proteicos na presença de GTP (JACKSON *et al.*, 2010). Os fatores proteicos que regulam este processo de transcrição, como eIF2, eIF3 e eIF4, são bastante conservados dentre os eucariotos e são, portanto, importantes alvos para a regulação da atividade ribossomal (DARNELL *et al.*, 2011). O fator eIF4, por exemplo, possui uma proteína ligante da sua unidade eIF4B (*eIF4 binding protein*) que o reprime constitutivamente, de forma a evitar ativação inespecífica (GRAFF *et al.*, 2008). A sinalização por insulina, no entanto, promove a dissociação deste fator de seu repressor, facilitando a síntese proteica através da ativação de mTOR (HOEFFER & KLANN, 2010). Já o fator eIF2 α interage naturalmente com seu repressor eIF2 β . Após seu recrutamento para o

complexo de iniciação, este complexo hidrolisa GTP em GDP e se dissocia, o que facilita a incorporação do primeiro aminoácido (metionina). Entretanto, a fosforilação do eIF2 α em serina impede o seu desacoplamento, inibindo a tradução (BIRKENFELD *et al.*, 2011). Pode-se esperar, portanto, que determinadas situações de estresse celular, como infecções virais, estresse oxidativo e excesso de síntese proteica, induzam a repressão da tradução através destes mecanismos. Nestas situações, apenas um subconjunto de RNAs mensageiros conseguem ser traduzidos, através de mecanismos que dispensam esse processo de reconhecimento ribossomo-RNA mensageiro (GRABER & HOLCIK, 2007).

A degradação proteica também é um mecanismo essencial de controle da função e atividade destas macromoléculas. O principal mecanismo de degradação proteica nas células é o sistema ubiquitina-proteassoma (*ubiquitin-proteasome system*- UPS). Neste, proteínas que devem ser degradadas são covalentemente ligadas a pequenos peptídeos conhecidos como ubiquitina em uma reação de três etapas. Após a poliubiquitinação, estas moléculas são direcionadas a um complexo macromolecular com diferentes atividades proteásicas, que convertem o substrato em pequenos peptídeos e aminoácidos livres (MABB & EHLERS, 2010).

De maneira geral, o controle da síntese proteica e a atividade do UPS modulam diversos eventos celulares, através da regulação da disponibilidade das proteínas celulares. Assim, processos como ciclo celular, crescimento, biogênese de organelas e secreção celular são fortemente associados ao correto funcionamento da síntese e degradação de proteínas.

1.4.2 Estresse do retículo endoplasmático (ERE)

O retículo endoplasmático é a organela que controla parte significativa da síntese proteica, uma vez que modificações pós-traducionais ocorrem em seu interior. Essa taxa é maior ainda em células com intensa atividade secretora, tais como células pancreáticas e neurais. Em adição, algumas proteínas encontram ambiente adequado para enovelamento somente dentro do retículo endoplasmático. Por estas razões, faz-se necessário que esta organela possua mecanismos próprios de controle de qualidade dos

produtos que saem dela. A primeira etapa de controle passa pelo reconhecimento imediato de proteínas nascentes e ligação de chaperonas e co-chaperonas que garantem o correto enovelamento protéico (GOECKELER & BRODSKY, 2010). Proteínas mal-enoveladas precisam ser rapidamente direcionadas para degradação, sob pena de se acumularem no interior do retículo e causarem disfunção nesta organela. Entretanto, o principal mecanismo de degradação proteica na célula é citosólico e uma maquinaria específica é requerida para promover essa translocação. Este aparato se chama degradação proteica associada ao RE (ERAD, do inglês endoplasmic reticulum-associated degradation) e possui alguns componentes proteicos que reconhecem os alvos, realizam a translocação e incorporam os substratos ao proteassoma. Disfunções nestes mecanismos tem sido implicada em uma série de patologias, tais como nefropatias, reumatismo, doença de Huntington e doença de Alzheimer (MEUSSER *et al.*, 2005).

1.4.3. Mecanismo de degradação associado ao RE (ERAD)

Se mesmo após sucessivas tentativas de chaperonamento uma proteína não for adequadamente manufaturada pelos mecanismos do controle de qualidade do RE, ela deve ser removida da via de montagem e submetida a mecanismos de lise proteassomal. A série de eventos que caracterizam o reconhecimento e translocação da proteína mal enovelada para o citosol e sua posterior degradação proteassomal é conhecida como mecanismo de degradação associado ao RE (ERAD) (KLEIZEN & BRAAKMAN, 2004).

1.4.3.1. Estresse do retículo endoplasmático (ERE) e a resposta a proteínas não enoveladas (UPR)

A maquinaria responsável pelo controle de qualidade do enovelamento proteico no RE é particularmente muito sensível a quaisquer perturbações na homeostase celular. Estados de hipóxia, isquemia, privação de sono, inanição, infecções, excesso de lipídeos e/ou carboidratos, flutuações da homeostase do cálcio e estresse oxidativo comprometem todo processo de qualidade do enovelamento, acarretando em uma maior produção e acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do RE (RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2007).

A persistência dessas perturbações leva ao acúmulo de proteínas mal enoveladas e sobrecarga de todo sistema de processamento com progressiva diminuição do chaperonamento proteico e degradação proteossomal, ocasionando maior concentração de proteínas mal enoveladas. Esta condição de acúmulo traz diversos prejuízos funcionais à célula e é denominada estresse do retículo endoplasmático (ERE) (RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2004).

Para amenizar os efeitos deletérios e preservar a integridade celular enquanto persiste a condição de ERE, a célula inicia um processo adaptativo conhecido como resposta a proteínas não enoveladas (*unfolded protein response* - UPR), no qual são ativados mecanismos adaptativos visando o restabelecimento da homeostase do retículo (RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2007).

A UPR é caracterizada como uma cascata de sinalização com finalidade de: 1) resgatar a qualidade da síntese proteica; 2) atenuar a síntese global de proteínas; 3) degradar RNAm's aberrantes; 4) aumentar a síntese de proteínas chaperonas e de enzimas antioxidantes; 5) aumentar a expressão gênica dos componentes de ERAD; 6) e respostas de autofagia. Além da modulação do correto enovelamento proteico, a UPR também está relacionada ao metabolismo de aminoácidos, função mitocondrial e detoxificação (RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2007).

A UPR inicia-se com a ativação de 3 proteínas associadas à membrana do RE que desencadeiam vias sinalizadoras de resposta, são elas: a enzima 1 dependente de

inositol (Ire1), o fator 6 de ativação transcricional (Atf6) e a proteína quinase do retículo endoplasmático *PKR-like* (Perk) (RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2004).

Em condições de homeostase, a chaperona Grp78 se encontra associada ao domínio transluminal das proteínas sensores (domínio amino-terminal da Ire1 e Perk, e carboxi-terminal do Atf6), mantendo-as em estado de latência. No início do quadro de ERE, quando o número de proteínas mal enoveladas excede a capacidade de enovelamento das chaperonas a Grp78 se desacopla das proteínas sensores para auxiliar no enovelamento, desencadeando autofosforilação/dimerização das proteínas e iniciando uma cascata de sinalização. Com o aumento progressivo do ERE, as proteínas sensores se replicam formando aglomerados e intensificam todas suas cascatas de sinalização. Após controle do ERE, os aglomerados se dissociam e o Grp78 volta a se associar a proteína sensor, diminuindo sua resposta adaptativa ao estresse (HETZ & SAXENA, 2017). A Ire1 é uma proteína transmembrana constituída por um domínio quinase e outro endoribonuclease e quando ativada se autofosforila e dimeriza, ativando a atividade endonuclease, levando ao processamento de RNAm's que codificam o fator de transcrição nuclear proteína 1 de ligação à caixa X (Xbp1). Para se ativar a Xbp1 remove um íntron de 26 nucleotídeos, induzindo um *frame-shift* em sua tradução e criando um novo domínio C-terminal, resultando na expressão de um fator de transcrição mais ativo e estável, o Xbp1 *spliced*. Este fator ativo se transloca para o núcleo e aumenta a expressão gênica relacionada aos mecanismos de ERAD e chaperonas. A Xbp1 *spliced* também atua na síntese de fosfolipídeos, importantes para a expansão da membrana durante o ERE. A Ire1 também está relacionada ao mecanismo de decaimento regulado de RNAm Ire1 dependente (RIDD), que degrada de forma ativa um conjunto de RNAm's responsáveis pela codificação das proteínas aberrantes (HETZ & SAXENA, 2017) (Figura 4).

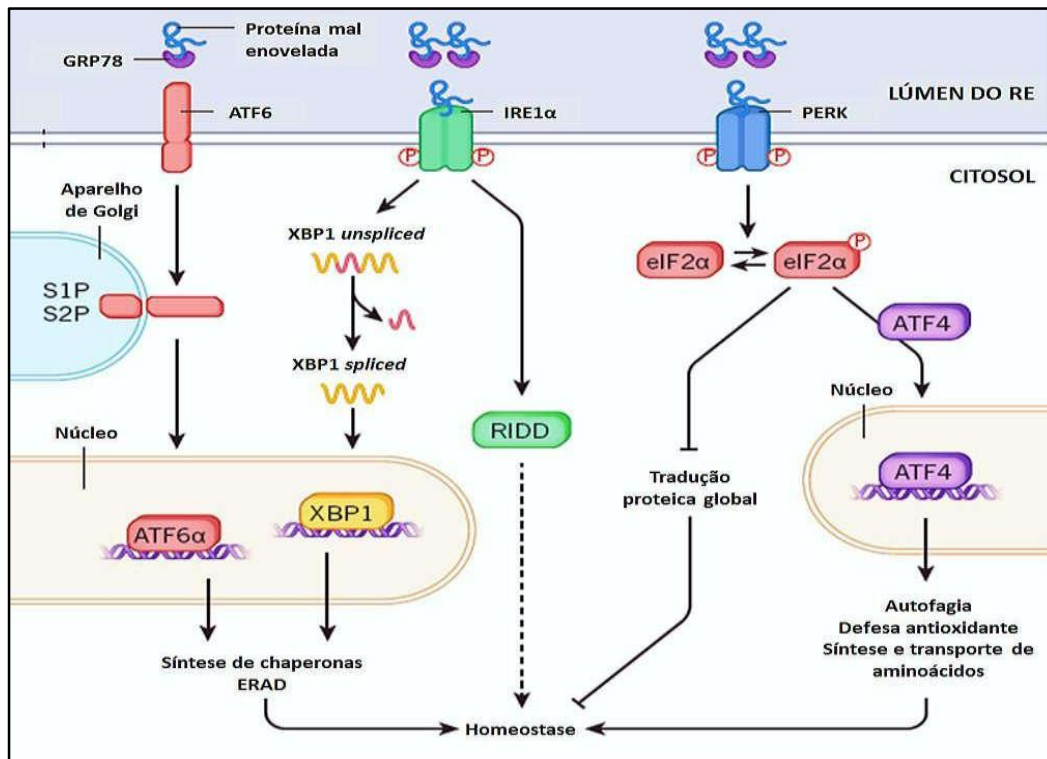


Figura 4. Cascata de sinalização adaptativa da UPR. Fonte: WANG & KAUFMAN, 2012

A sinalização adaptativa da UPR é iniciada após a ativação paralela das proteínas sensores Atf6, Ire1 α e Perk no RE. Em situações de ERE, relacionado ao acúmulo de proteínas mal enoveladas, as chaperonas Grp78 se desacoplam da porção luminal destas proteínas sensores para promover atividades de chaperonamento, e com isso, subsequentemente a cascata de sinalização adaptativa da UPR é ativada. Após ativação, o Atf6 é mobilizado para o aparelho de Golgi, onde é clivado, liberando um fator de transcrição ativo (Atf6f) que migra para o núcleo. A Ire1 α ativada se autofosforila e dimeriza promovendo a codificação e *spliced* do fator de transcrição Xbp1, permitindo sua entrada no núcleo. Adicionalmente, a Ire1 α ativa o mecanismo de RIDD, que degrada RNAs aberrantes. Por fim, a Perk autofosforilada e dimerizada, promove o processo de fosforilação do fator eIF2 α , que inibe a tradução global de proteínas e codifica o fator de transcrição Atf4, que também migra para o núcleo. No núcleo, os fatores Atf6f, Xbp1 *spliced* e Atf4, promovem em conjunto síntese de chaperonas, ativação da ERAD, autofagia, síntese de enzimas antioxidantes e transporte de aminoácidos, que somado a inibição da tradução global proteica e degradação de

RNAm's aberrantes, garante a diminuição do estresse do retículo e retorno da homeostasia celular (TSURU *et al.*, 2016).

O Atf6 (isoformas α e β), após o desacoplamento da Grp78, é translocado em vesículas para o aparelho de Golgi, sendo clivado por proteases liberando um fator de transcrição ativo (Atf6f) que induz a expressão de genes que codificam os componentes da ERAD e de forma ainda não totalmente elucidada a Xbp1 (NIEDERREITER *et al.*, 2013) (Figura 5).

A Perk é uma quinase seril-treonil e quando dissociada da Grp78 se dimeriza e induz por autofosforilação a ativação de seu domínio quinase. A ativação da Perk atenua a síntese geral de proteínas por meio da fosforilação do fator eucariótico iniciador de tradução 2 (eIF2 α). O eIF2 α também permite a tradução do RNAm que codifica o fator de transcrição Atf4, induzindo expressão gênica relacionada à ERAD, enovelamento de proteínas, metabolismo de aminoácidos e autofagia – mecanismo regulado pelos lisossomos de eliminação de agregados proteicos e organelas danificadas (WALTER & RON, 2011).

Apesar de todas as proteínas sensores se ativarem ao mesmo tempo após o desacoplamento da Grp78, as vias de sinalização e respostas desencadeadas não ocorrem de forma simultânea e desta maneira, fases diferentes da UPR são moduladas por cada uma delas. O início da UPR é marcado pela ativação da Perk/eIF2 α e consequente inibição da tradução proteica. Como o eIF2 α não depende de translocação ao núcleo para desencadear respostas, esta inibição ocorre rapidamente (cerca de 30 minutos após o desacoplamento) e o influxo de proteínas nascentes é interrompido, impedindo a saturação do lúmen. A seguir, temos ativação dos mecanismos de RIDD modulado pela fosforilação da Ire1 (HOLLIEN *et al.*, 2009). O processo de clivagem do Atf6 se dá em paralelo à ativação da Perk, no entanto como são necessários processos de exportação do sensor, todas as respostas moduladas se dão em um momento posterior as respostas mediadas pelo eIF2 α (OKADA *et al.*, 2002).

Em uma segunda etapa do processo de UPR é iniciada a síntese de proteínas chaperonas pelo Atf6f, resposta esta que será mantida posteriormente pela atividade da Xbp1 *spliced* advinda da sinalização da Ire1. Entre a produção de chaperonas e ativação da Xbp1, são desencadeadas respostas metabólicas, redox e de autofagia moduladas pela Perk/Atf4 (AMERI & HARRIS, 2008). Por fim, temos a degradação das proteínas mal enoveladas pelo mecanismo de ERAD modulado pela Xbp1 *spliced* e pelo Atf6f (HETZ & SAXENA, 2017) (Figura 5).

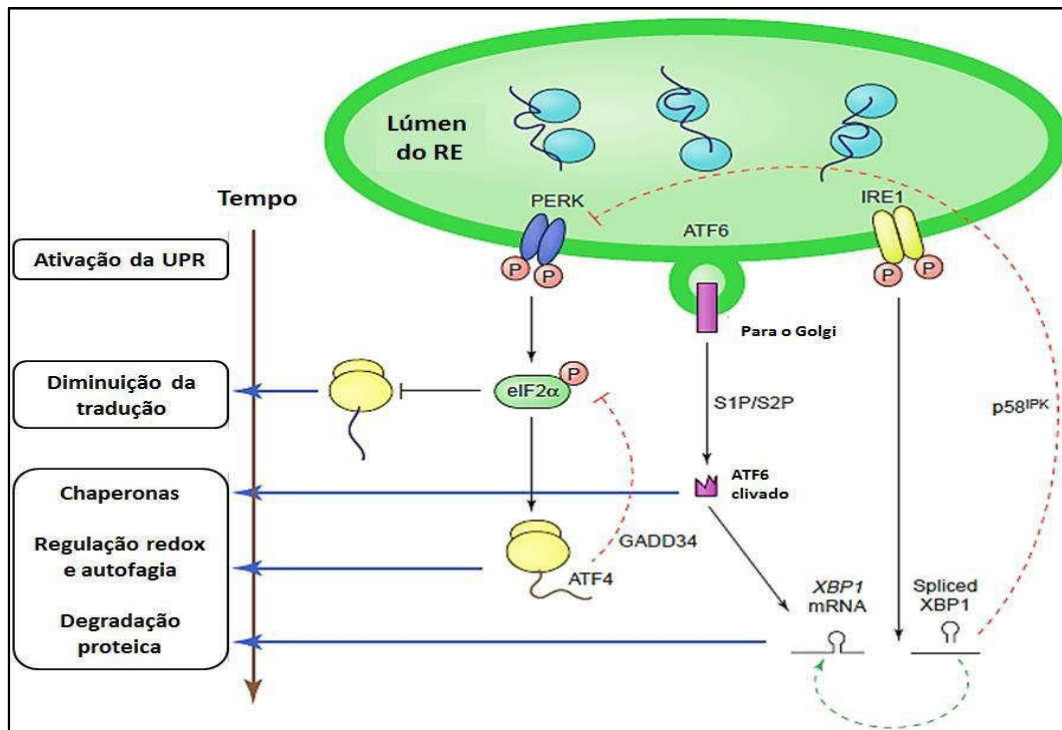


Figura 5. Ordem cronológica das respostas adaptativas da UPR. Fonte: RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2004

Em conjunto, a Xbp1 *spliced*, Atf6f e o Atf4 regulam a expressão e a atividade de marcadores chave para o controle de danos relacionados ao ERE. No entanto, em condições onde este quadro de ERE é demasiadamente grave e/ou prolongado, a UPR pode não ser capaz de controlar a expansão de efeitos deletérios do lúmen para a célula. Nestas condições de ERE crônico, as mesmas proteínas sensores da UPR responsáveis por iniciar uma sinalização pró-adaptativa ao estresse podem iniciar uma sinalização pró-apoptótica, levando a morte celular precoce (HETZ & SAXENA, 2017). Mecanismo de degradação associado ao RE (ERAD).

Assim, se após várias tentativas uma proteína não for adequadamente manufaturada pelos mecanismos do controle de qualidade do RE, deverá ser retirada da via de montagem e levada a mecanismos de lise proteassomal. Sendo as proteínas, moléculas essenciais para o desenvolvimento de diversas reações bioquímicas, falhas em sua conformação são indícios de desregulações por vezes incontornáveis para o indivíduo. Desta maneira, compreender as possíveis causas das má conformações proteicas e como evitá-las, consistem em boas estratégias para proporcionar a melhoria da saúde pública como um todo.

2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o impacto do estresse do retículo endoplasmático hipocampal sobre o surgimento de declínios cognitivo, comportamental e motor tardios em camundongos que sobrevivem ao quadro de sepse.

2.1. Objetivos específicos

- Induzir a sepse em camundongos através do modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP), e caracterizá-la através da avaliação da mortalidade dos animais na fase aguda da doença.
- Provocar um insulto com uma quantidade não tóxica (1pmol) de oligômeros de beta-amilóide (A β O) através de uma única injeção intracerebroventricular (ICV) 45 dias após a indução da sepse.
- Avaliar o impacto da sepse e do insulto provocado sobre as funções cognitivas, comportamentais e motoras nos animais sobreviventes da sepse que receberam a injeção ICV de A β O;
- Investigar a expressão gênica/proteica de marcadores-chave de vias de sinalização envolvidas no estresse do retículo endoplasmático, no tecido hipocampal dos grupos experimentais;
- Comparar os possíveis danos neurofuncionais e neuro-moleculares dos grupos experimentais de sepse que receberam a injeção ICV de A β O.

3. METODOLOGIA

3.1. Modelo animal

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com idade entre 6 e 8 semanas, pesando entre 25 a 30 g, oriundos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL/FIOCRUZ) ou do biotério do Laboratório de Neurociências da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os animais foram acomodados em grupos de cinco por gaiola, com ração e água fornecidos *ad libitum* e com ciclos de claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados em conformidade e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRJ sob o número de protocolo 130/16.

A indução de sepse foi realizada pelo modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP, do inglês *cecal ligation and puncture*) (WICHTERMANN, BAUE & CHAUDRY, 1980; BAKER *et al.*, 1983), que consiste em inicialmente, anestésiar os camundongos, no qual foi utilizado Ketamina 100mg/kg e Xilazina 20mg/kg administrados por via intraperitoneal (IP). Após a realização de tricotomia na região abdominal e assepsia com álcool 75%, os camundongos foram submetidos a uma laparotomia com incisão longitudinal de aproximadamente 1 cm na linha média abdominal para permitir a exposição do ceco. O ceco foi firmemente ligado com fio de seda 3,0, na região abaixo da válvula ileocecal, perfurado, transpassado uma única vez com uma agulha estéril calibre 18G e, logo após, foi levemente comprimido para extravasamento do conteúdo fecal. Em seguida, o ceco foi recolocado na cavidade peritoneal, a qual foi suturada com grampos pós-cirúrgicos (AUTOCLIP BD 9mm). Os procedimentos podem ser observados na Figura 6. Todos os animais foram devolvidos às suas gaiolas, com livre acesso a comida e água. Alguns animais (falso-operados ou *sham*) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, contudo, o ceco não foi ligado, tampouco perfurado. Finda a cirurgia, os animais receberam hidratação (1mL de solução fisiológica subcutânea, imediatamente), por via subcutânea, para reposição de fluido (BENJAMIN, 2001) e antimicrobiano (Meropeném 5, 24 e 48h após a cirurgia 1mg/mL). Além da sobrevivência, foram observados os sinais clínicos de instalação de uma resposta inflamatória sistêmica como

pilo ereção, tremores, prostração, atonia muscular e diminuição da movimentação. Esses sinais clínicos intensos foram facilmente identificados nos animais do grupo CLP, mas não nos do grupo sham.

Após 45 dias, os animais foram subdivididos em 4 grupos: animais sham que receberam injeção ICV de veículo (PBS), animais sham que receberam injeção ICV de uma dose não tóxica de $A\beta$, animais CLP que receberam injeção ICV de veículo (PBS) e animais CLP que receberam injeção Intracerebroventricular (ICV) de uma dose 1pmol não tóxica de $A\beta$. Esses animais receberam a injeção ICV no 45º dia. No 46º dia foi realizado o teste de reconhecimento de objetos para avaliar a memória declarativa, no 47º dia teste Step Down para avaliar memória de medo e sacrifício dos animais no 48º dia para retirada do hipocampo para avaliação bioquímica.

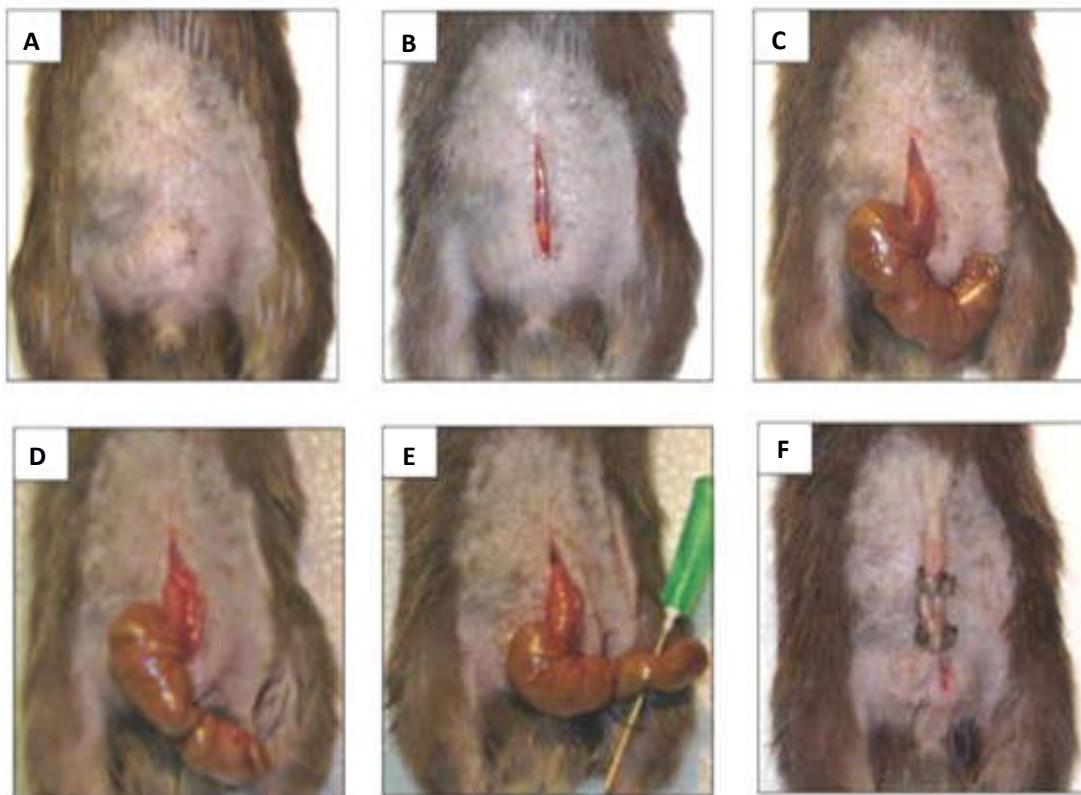


Figura 6: A série de fotos ilustra os estágios da cirurgia CLP. (A,B) Animal anestesiado, tricotomizado e feita incisão. Em seguida, (C) o ceco é exposto, (D) amarrado, (E) perfurado por agulha hipodérmica e colocado de volta no abdômen. (F) Incisão fechada com grampo. Fonte: adaptado de RITIRSCH *et al.*, 2009.

3.2. Injeção intracerebroventricular (ICV)

A injeção ICV se iniciou com animais sendo anestesiados usando um sistema de vaporização com fornecimento de oxigênio constante e 2,5% de Isoflurano (Cristália, Brasil) no interior de uma caixa de acrílico retangular . Uma vez anestesiados, os animais foram imobilizados e tiveram sua pele da cabeça gentilmente esticada na direção posterior. As injeções foram realizadas cerca de 1 mm lateralmente do ponto equidistante dos dois olhos e cerca de 0,1 mm posterior da linha imaginária desenhada do ponto mais posterior dos olhos. Foram utilizadas agulhas gengivais 30-G cortadas com 3 mm de comprimento acopladas a uma seringa Hamilton de 10 µl. As injeções foram realizadas por um pesquisador treinado que obteve mais de 85% de sucesso em treinamento feito com corante azul nos mesmos locais alvo das injeções deste experimento a fim de averiguar a acurácia das mesmas no ventrículo lateral. Cada animal recebeu 3 µl de solução de acordo com o protocolo utilizado.

3.3. Experimentos comportamentais

3.3.1. Campo aberto

A avaliação da atividade motora dos animais foi realizada através do teste do campo aberto. O aparato do campo aberto (CA) consiste em uma caixa medindo 50 cm x 50 cm x 39 cm de madeira e com um chão de cor preta (Figura 7) colocada numa sala com baixa luminosidade e isolada acusticamente.

Animais foram previamente ambientados. Durante o experimento, cada animal foi colocado no centro da arena e deixou-se que este explorasse livremente, enquanto registrava o seu comportamento durante cinco minutos. Após cada sessão, a arena foi limpa com uma solução de etanol 70%, para minimizar as pistas de odor deixadas pelo animal anterior. Os parâmetros comportamentais analisados foram: o número de cruzamentos (quando o animal invade com as quatro patas um dos quadrantes da arena) e o número de levantamentos (quando o camundongo se apoiava nas patas posteriores, com o corpo perpendicular ao piso, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando ou não, com as patas anteriores, as paredes do campo aberto).

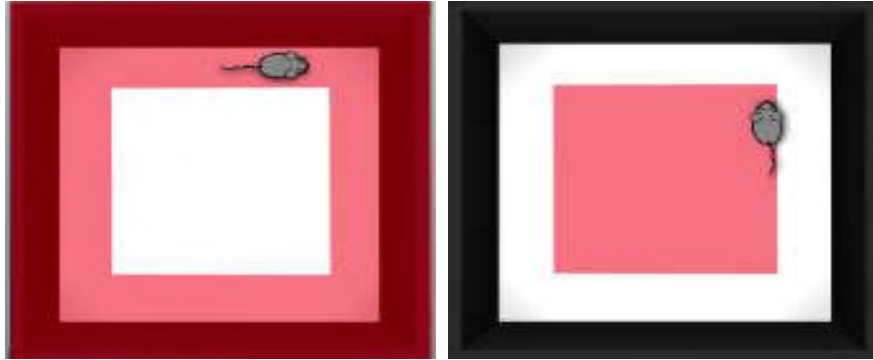


Figura7: Aparato do campo aberto. Consiste em uma caixa de fundo preto . Em cada sessão experimental, são avaliados o número de cruzamentos e levantamentos realizados como medida das atividades locomotora e exploratória dos animais.

3.3.2. Reconhecimento de objetos

Quando roedores são apresentados a objetos familiares e novos, eles despendem um tempo maior para explorar o objeto novo. Este comportamento típico tem sido utilizado no desenho de um paradigma comportamental conhecido como tarefa de reconhecimento de objeto (RO) o qual vem sendo amplamente utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas (MOSES *et al.*, 2005). Os animais foram deixados na sala de experimentação em suas gaiolas para ambientação sob luz indireta antes de iniciar propriamente o teste. Em seguida, individualmente colocados em um aparato de campo aberto contendo 2 objetos (como legos, padronizados anteriormente) diferentes (A e B) sendo-lhes permitido explorá-los livremente durante 5 min e sendo gravadas todas as sessões pelo software ANY-Maze (Stoelting CO.,IL USA) para contabilização ao final do teste para que a presença do experimentador e possíveis ruídos não interferissem no comportamento dos animais e mascarassem os resultados. A sessão de teste foi realizada entre 1-3h após a sessão de treino. Durante o teste, os animais foram reintroduzidos individualmente no aparato de campo aberto e mantidos por 5 min, sendo que um dos objetos apresentados durante o treino foi aleatoriamente substituído por um objeto novo (B será substituído por C). O tempo gasto explorando cada objeto foi medido por um observador e expresso como porcentagem do tempo total de exploração findado o teste. Para determinação de possíveis alterações na função motora, a exploração e o ato de levantar sobre as duas

patas traseiras, executados pelos animais durante a fase de habituação foi quantificado (Figura 8).

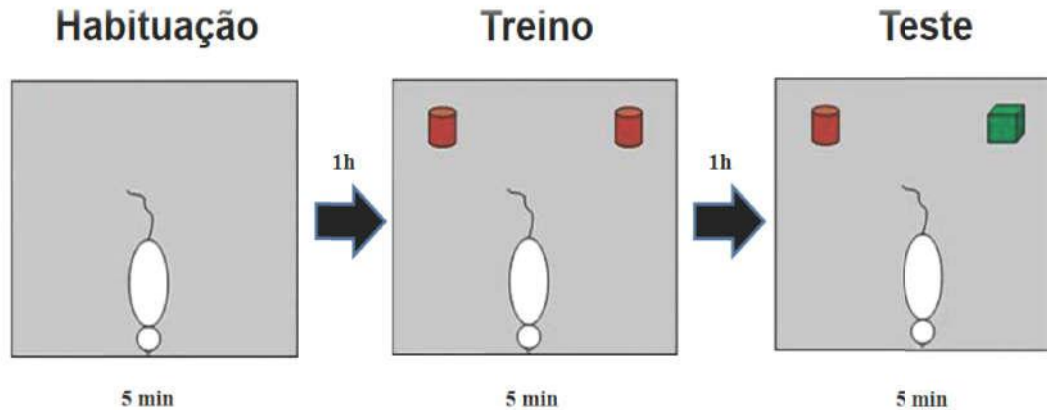


Figura 8: Teste de reconhecimento de objetos. São ilustradas as sessões de habituação, treino e teste, com os objetos utilizados em cada etapa.

3.3.3. Step-Down

A esquiava inibitória, do inglês, *Step-Down*, tem por objetivo avaliar a aprendizagem de uma tarefa aversiva onde, na sessão de treino, o animal ao descer da plataforma, recebe choque de baixa intensidade. Na sessão de teste, o animal é novamente exposto àquele ambiente para avaliação da sua memória ao contexto. Para avaliar o quanto o animal aprendeu durante a reexposição ao aparato, mede-se o tempo que leva para descer da plataforma (latência de descida). Quanto mais tempo ficar na plataforma, maior será a latência de descida, indicando que ocorreu aprendizagem na relação entre o contexto e a ocorrência do choque (estímulo aversivo) (IZQUIERDO & MEDINA, 1997; GOLD, 1986).

Para a realização do experimento, foi usada uma caixa de ferro (30 x 5,0 x 15 cm) com a parede frontal de vidro removível; assoalho formado por 13 barras paralelas de aço inoxidável, separadas 1,0 cm de distância. Sobre as barras, ao centro do aparelho, está fixada uma plataforma de madeira 5x5cm (Figura 9). O experimentador tem controle sobre a intensidade da estimulação elétrica, o qual o animal será submetido.

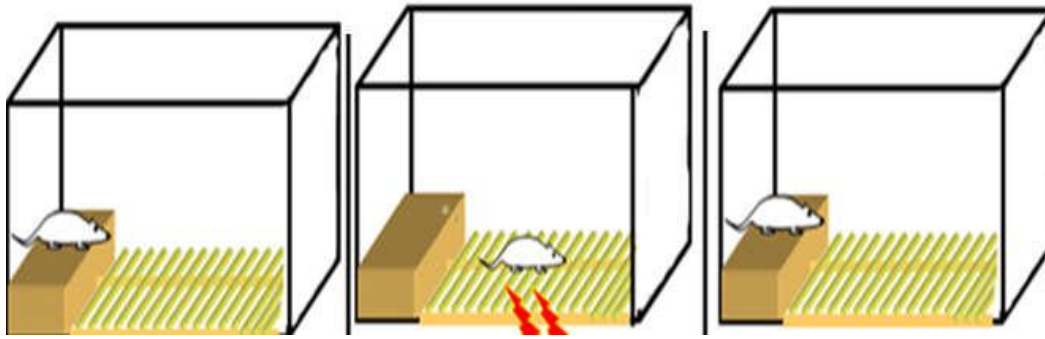


Figura 9: Aparelho para teste esquiva inibitória. Fonte: https://www.researchgate.net/figure/A-schematic-of-the-experimental-procedure-for-the-one-trial-step-down-avoidance_fig2_264538420. Acesso em Outubro 2018

Os animais primeiro foram submetidos a uma sessão de treinamento individual na qual eram cuidadosamente colocados sobre a plataforma fixa no centro da caixa de esquiva inibitória para que explorassem a mesma. Quando desciam da plataforma com as quatro patas sobre as barras de aço, que constituem o assoalho da caixa, recebiam o choque de 0,5mA por 10 segundos (CAMMAROTA *et al.*, 2005). Em seguida, eram retirados e voltavam para a gaiola. Afim de avaliar a retenção da memória de esquiva de longa duração os animais foram submetidos a uma sessão de teste comportamental 24 horas após o treino. O procedimento utilizado na sessão de teste foi idêntico àquele empregado na sessão de treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebia o choque. Para ambas as sessões, foi adotado como tempo máximo de descida da plataforma 300 segundos (5 minutos). Animais que na sessão de treino não desceram da plataforma antes de transcorridos 300 segundos foram eliminados do estudo.

3.4. Análise de expressão gênica por reação de transcrição reversa, seguida de reação da polimerase em cadeia (RT-PCR)

3.4.1. Preparo das amostras de hipocampo

Os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento da cervical com posterior retirada do cérebro e coleta do hipocampo, que foi imediatamente colocado em microtubos de 2mL e armazenados a -80°C para melhor conservação do conteúdo de RNAm.

3.4.2. Extração de RNA total do tecido e quantificação

O isolamento do RNA total do tecido foi feito utilizando-se o método básico recomendado de extração de RNA usando TRIzol (Invitrogen Life Technologies) e homogeneização do tecido com um pistão. Cada 100 mg de tecido macerado recebe 1 mL de reagente TRIzol e é acrescido de 250 µL de clorofórmio, sendo então transferido para microtubo, e agitado vigorosamente. Após 5 min de incubação a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas, a solução foi centrifugada por 12.000 x g durante 15 min a 4°C.

A fase aquosa (até 60% do volume original de TRIzol) foi então transferida novamente para um microtubo limpo contendo isopropanol (0,5 mL de Isopropanol por mL de TRIzol usado), incubada por 10 min a temperatura ambiente e precipitada por centrifugação (12.000 x g, 30 min a 4 °C). O pellet foi lavado 3 vezes com 500 µL de etanol 75%, e seco a 37 °C por 10 min. O preparo foi então ressuscitado em 10 µL de água livre de RNase. O RNA total foi quantificado no Nanodrop (ND-1000Spectrophotometer).

3.4.3. Síntese do DNA complementar

Realizou-se a síntese do DNA complementar a partir de 1 µg de RNAtotal. Após um passo inicial de incubação com a DNase I, para eliminação de possível DNAcontaminante, seguiu-se exatamente a especificação do fabricante da enzima utilizada (Superscript III – Invitrogen).

3.4.4. RT-PCR

A expressão de genes de interesse foi analisada por PCR em um sistema de RT-PCR utilizando o kit SYBR (Aplicado a Biosistemas). Actina foi utilizado como controle endógeno. Os primers para amplificação dos alvos utilizados nas reações de PCR foram sintetizados pela Invitrogen: para ATF4, forward:5'-GTTTGA^{CTTCGATGCTCTGTTTC}-3', reverse:3'-

GGGCTCCTTATTAGTCTCTTGG-5'; CHOP, forward: 5'-
 CTGGAAGCCTGGTATGAGGAT-3', reverse: 3'-
 CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGT-5'; XBP1s, forward: 5'-
 GAGTCCGCAGCAGGTG-3', reverse: 3'-GTGTCAGAGTCCATGGGA-5'; TNF- α ,
 forward: 5'-ATGAGCACAGAAAGCATGA-3', reverse: 3'-
 AGTAGACAGAAGAGCGTGGT-5'. Os valores limites de ciclo (Ct) foram utilizados
 para calcular as mudanças na expressão de gene utilizando o método 2_{-DCt}. Em todos
 os casos, as reações foram realizadas em volumes de reação de 15 μ L.

3.5. Análise estatística dos dados

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism v. 6 e utilizaram como níveis de significância 5%. Nos experimentos de reconhecimento de objetos, foi utilizado o teste-t contra o valor teórico de 50% (one-sample t-test). Para todos os demais, foi utilizado análise de variância (ANOVA) de uma via e teste pos-hoc de Holm-Sidak.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do modelo animal de sepse através da ligação e perfuração do ceco. Mortalidade e parâmetros clínicos

4.1.1. Mortalidade

Dos pacientes que apresentam sepse, tem-se observado uma estimativa surpreendente de que aproximadamente 30 a 55,7% vão à óbito (POTT-GODOY *et al.*, 2008). Tendo em vista a verificação da padronização do modelo de CLP e mimetizar o que se dá na clínica, analisamos a taxa de sobrevivência dos grupos *sham* e CLP com o uso do programa GraphPad Prism 6, onde foram lançados os grupos e seus respectivos eventos (óbito ou sobrevivência).

Como descrito previamente, o modelo animal de ligação e perfuração do ceco mimetiza a sepse na clínica e é padrão ouro na indução da sepse em animais. Conseguimos reproduzir com sucesso o modelo descrito. Como era esperado, o grupo *sham* apresentou 100% de sobrevivência. O grupo CLP, a partir do primeiro dia até o terceiro dia após a realização da cirurgia, teve casos de óbito de 30% em 36 horas correspondentes aos 30-55,7% observado na clínica (Figura 10).

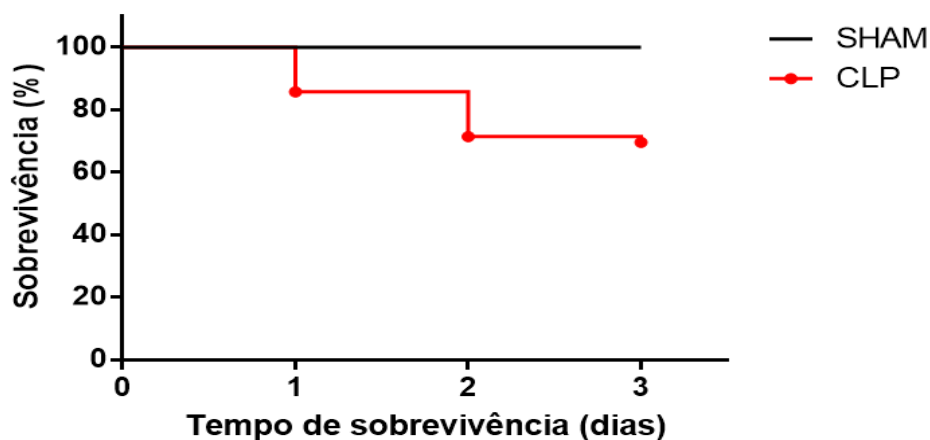


Figura 10: O modelo de ligação e perfuração do ceco induz sepse em camundongos, causando morte em 30% dos animais: grupo *sham* apresentou 100% de sobrevivência e o grupo CLP, a partir do primeiro dia até o terceiro dia após a realização da cirurgia. N = 25 Sham e 60 CLP.

4.1.2. Parâmetros clínicos

Neste modelo animal de sepse, os camundongos mostram diminuição do movimento e letargia em 4 horas após a cirurgia, e estes sinais se tornam piores em 12 horas após infecção; se os camundongos sobreviverem após 36 horas, comportamento recuperado para um estado saudável por 48 horas. Além da sobrevivência, foram observados os sinais clínicos de instalação de uma resposta inflamatória sistêmica como pilo ereção, tremores, prostração, atonia muscular e diminuição da movimentação. Esses sinais clínicos intensos foram facilmente identificados nos animais do grupo CLP, mas não nos do grupo sham.

4.2. Efeitos de um insulto com uma dose não tóxica de oligômeros de Beta-amilóide em camundongos sobreviventes da sepse sobre os parâmetros locomotores e cognitivos

4.2.1. Parâmetros locomotores

Os animais sobreviventes receberam uma injeção ICV de uma quantidade não tóxica de A β (1pmol) 45 dias após a indução da sepse. O teste de campo aberto para avaliar atividade locomotora foi realizado 24h após a injeção. Como esperado, os animais sham assim como os animais CLP não apresentaram prejuízo locomotor (Figura 11). Em ambos os grupos não houve diferença da distância percorrida. A locomoção dos animais não foi afetada pela sepse nem pela injeção ICV de A β (1pmol) 46 dias após a cirurgia. A base do estabelecimento de comparação entre os grupos, o grupo naive foi o que recebeu a dose tóxica de 10pmol de A β e este grupo não apresentou alteração na distância percorrida.

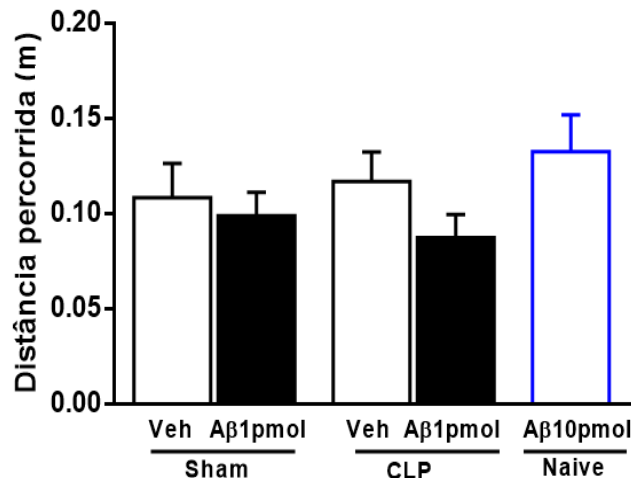


Figura 11: Efeitos da sepse e da injeção de A β 45 dias após a cirurgia sobre a locomoção dos animais. Distância percorrida por animais Sham e CLP após injeção ICV analisada pelo teste Campo aberto. Não houve diferença estatística entre os grupos. N = 25 Sham e 60 CLP. \pm EPM. ANOVA.

4.2.2. Memória de reconhecimento de curto prazo

A avaliação da memória declarativa dos camundongos swiss sobreviventes da sepse foi avaliada 45 dias após a sepse. Os animais receberam uma injeção ICV de A β (1 pmol) e 24h depois foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos. Durante o treino, todos os animais investigaram os dois objetos de maneira semelhante, indicando ausência de preferência por algum deles (dados não mostrados). Entretanto, esta condição mudou durante teste, e os animais que sobreviveram à sepse perderam a capacidade de realizar a tarefa, demonstrando uma preferência pelo objeto familiar em relação ao grupo sham ($p = 0,019$ one-sample t-test contra o valor teórico para o acaso, 50%). O grupo CLP não demonstrou interesse pelo objeto novo, explorando os dois objetos de forma semelhante. Esse resultado indica que o insulto causado pela injeção de uma quantidade não tóxica (1pmol) de A β provocou um prejuízo de memória declarativa em animais sobreviventes da sepse no tempo em que esses animais estariam completamente recuperados e não deveriam apresentar sequelas, como visto anteriormente. Os animais sham tiveram sua memória preservada mesmo após a injeção ICV de A β (1pmol). Observa-se que o desempenho do grupo CLP foi semelhante ao grupo naive que recebera por injeção ICV a dose tóxica, dosagem esta já descrita na literatura como prejudicial para o sistema neurocognitivo (FIGUEIREDO *et al.*, 2016) (Figura 12).

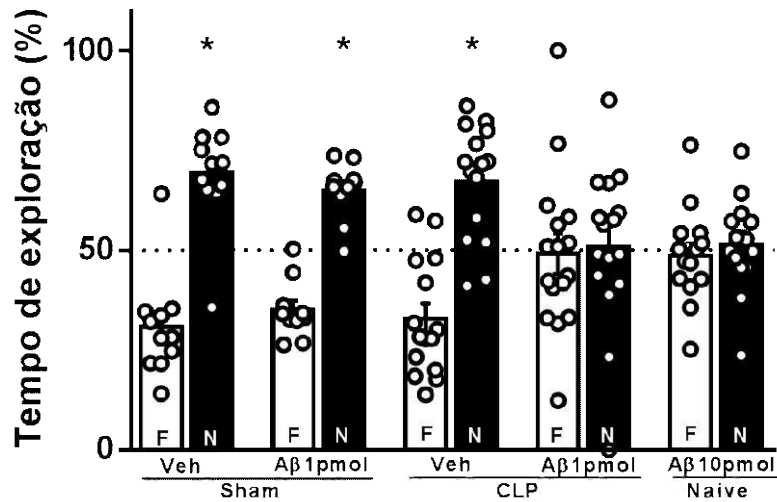


Figura 12: Animais sobreviventes da sepse que receberam uma injeção ICV de A β 1pmol 45 dias depois da cirurgia apresentaram prejuízo de memória declarativa. Um grupo Naive recebeu a dose tóxica de A β 10pmol, na qual confere prejuízo cognitivo, também foi submetido ao teste. Grupos Sham-Veh, Sham-A β 1pmol e CLP -Veh exploraram mais o objeto novo. O grupo CLP-A β 1pmol explorou mais o objeto novo tal qual o grupo Naive que recebeu a dose tóxica de A β 10pmol. (F) objeto familiar (N) objeto novo. * Diferente do valor teórico 50% (one-sample t-test, $p < 0,05$). Valores representados como média \pm EPM. N = 15 a 20 animais/grupo.

4.2.3. Memória de medo

No processo de aprendizagem e memória, ocorrem alterações por conta da plasticidade cerebral que contempla a capacidade do SNC mudar sua estrutura por conta de experiências anteriores. A tarefa da esquiva inibitória (*Step-Down*), visa avaliar a aprendizagem de uma tarefa aversiva. Por meio deste teste, foi visto que não houve diferença entre os grupos. Todos os grupos apresentaram o tempo de latência semelhante. Isso demonstra que todos os grupos aprenderam a tarefa. A dose subtóxica de A β não provocou prejuízo na memória de medo dos animais sobreviventes da sepse (Figura 13).

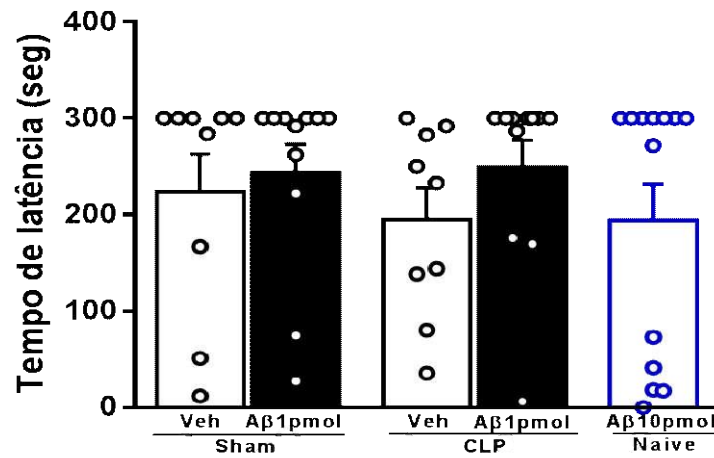


Figura 13: Animais sobreviventes da sepse que receberam uma injeção ICV de Aβ1pmol 45 dias depois da cirurgia não apresentaram prejuízo da memória de medo. Em 45 dias após a indução da sepse, os animais sobreviventes da sepse receberam uma injeção ICV de Aβ1pmol ou veículo. 48 horas depois os animais foram submetidos ao teste Step-Down. O gráfico demonstra o tempo de latência em segundos que os animais levaram para descer da plataforma após passarem pela sessão de treino, onde recebem um estímulo aversivo. N= 15 a 20 animais/grupo. ANOVA.

4.3. RT-PCR do Hipocampo

4.3.1. Análise dos níveis do gene TNF-α

O gene TNF codifica a citocina TNF-α, pertencente a superfamília do fator de necrose tumoral TNF, no qual está envolvida com apoptose, metabolismo lipídico e resistência à insulina, com possível função neuroprotetora (POTT-GODOY *et al.*, 2008)

Os níveis de TNF-α até 30 dias de indução da sepse encontra-se elevado e em 45 dias, retorna aos níveis basais, com a reversão do prejuízo cognitivo (FIGUEIREDO *et al.*, 2016). Coletou-se o hipocampo e pela técnica de PCR, analisou-se os níveis de TNF-α nessas amostras. Os grupos sham-veh, sham-Aβ1pmol e CLP-veh não apresentaram aumento desse gene, em contrapartida, o grupo CLP-Aβ1pmol mostrou uma tendência na sua elevação possibilitando pensar que as alterações cognitivas observadas nos animais teriam envolvimento do TNF-α nesta situação. Devido ao baixo número de animais, não houve diferença estatística para validar tais achados (Figura 14).

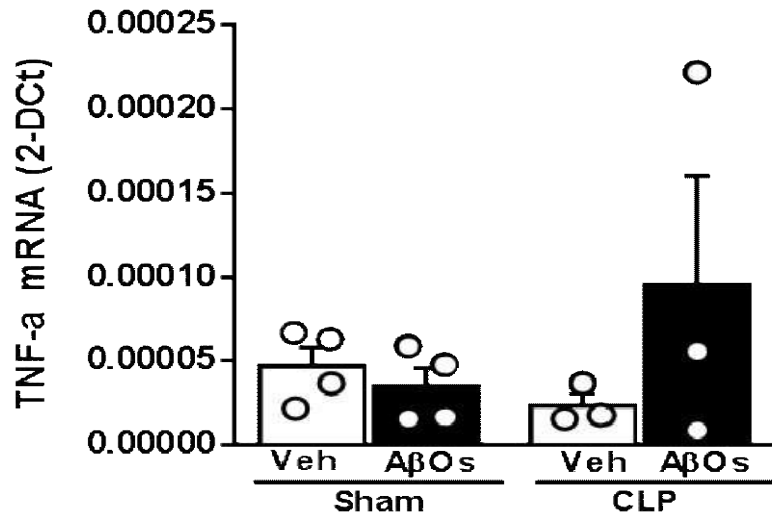


Figura 14: Gráfico representativo do conteúdo de RNAm do TNF- α corrigidos pelo RNAm de beta actina obtidos em ensaios de RT-PCR do hipocampo do grupo Sham e CLP. Valores expressos em 2-DCT como média \pm EPM. N=3 a 5/grupo.

4.3.2. Análise dos níveis do gene ATF-4

O gene ATF4 codifica o fator de transcrição ATF4 e em condições de estresse, como hipóxia e privação de glicose, leva ao estresse do retículo iniciando o aumento da síntese do ATF4. Tal fator de transcrição é um repressor de memória que bloqueia a nova expressão de genes necessários para as memórias (Atlas de genética e citogenética, 2018) Neste ensaio, não vemos diferença dos níveis do fator de transcrição ATF4 em nenhum dos grupos (Figura 15).

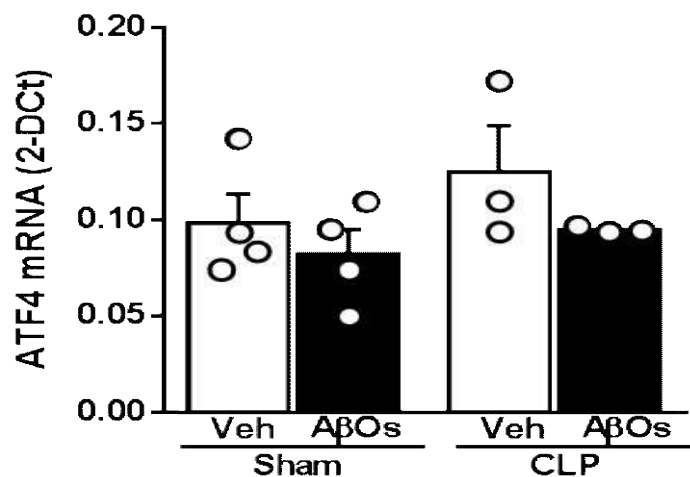


Figura 15: Gráfico representativo do conteúdo de RNAm do ATF4 corrigidos pelo RNAm de beta actina obtidos em ensaios de RT-PCR do hipocampo do grupo Sham e CLP. Valores expressos em 2-DCT como média +/- EPM(N=3 a 5/grupo) .

4.3.3. Análise dos níveis do gene CHOP

O gene *DDIT3* é o codificador do gene CHOP que atua no estresse do retículo endoplasmático podendo induzir a ativação da enzima oxidoredutina 1 ER (Ero1) , no qual causará a liberação de cálcio do retículo endoplasmático para o citoplasma , levando a apoptose (LI, 2009). Não foi observado diferenças de expressão desse gene entre os grupos analisados (Figura 16) .

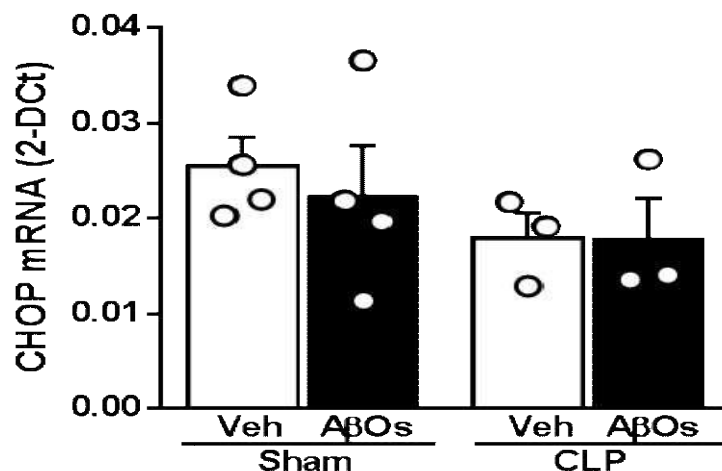


Figura 16: Gráfico representativo do conteúdo de RNAm do CHOP corrigidos pelo RNAm de beta actina obtidos em ensaios de RT-PCR do hipocampo do grupo Sham e CLP. Valores expressos em 2-DCT como média +/- EPM(N=3 a 5/grupo) .

4.3.4. Análise dos níveis do gene XBP1

O gene XBP1 codifica o fator de transcrição XBP1 que está envolvido com o bom funcionamento do sistema imunológico e na resposta ao estresse celular (YOSHIDA *et al.*, 2006). Anormalidades na XBP1 levam a um aumento do estresse de ER e causando uma maior suscetibilidade a processos inflamatórios que podem contribuir para a doença de Alzheimer (TINTO *et al.*, 2011).

Foi visto uma tendência considerável no aumento dos níveis do fator de transcrição XBP1 no grupo CLP que recebeu injeção ICV de A β O sugerindo uma associação com os mecanismos desencadeados pela sepse (Figura 17). Com o baixo número de animais, não houve diferença estatística para validar tais achados.

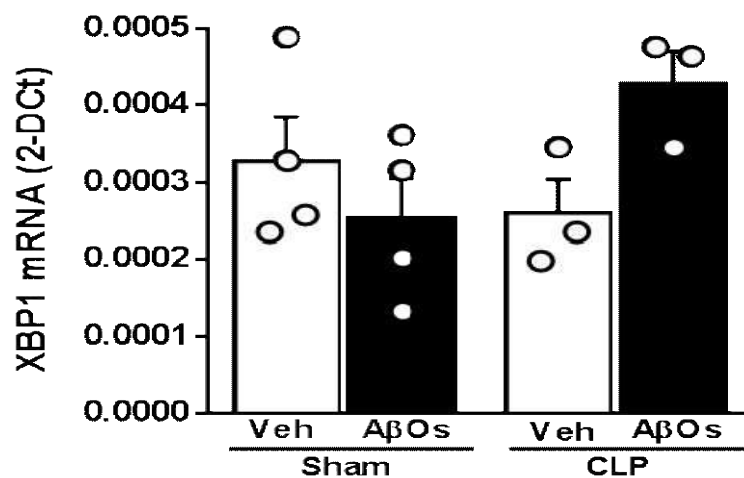


Figura 17: Gráfico representativo do conteúdo de RNAm do XBP1 corrigidos pelo RNAm de beta actina obtidos em ensaios de RT-PCR do hipocampo do grupo Sham e CLP. Valores expressos em 2-DCT como média +/- EPM. N=3 a 5/grupo.

5. DISCUSSÃO

A sepse tem representado uma fonte de preocupação para a sociedade e órgãos de saúde, visto que a compreensão dos mecanismos de atuação são incompletos, assim como as maneiras de evitar seus possíveis prejuízos futuros, que consiste na EAS. Neste estudo, conseguimos reproduzir com sucesso o modelo de sepse pela ligação e perfuração do ceco, onde o índice de mortalidade e os aspectos clínicos observados nos animais foram compatíveis com o que se observa na clínica.

Pacientes sobreviventes à sepse, apresentam um quadro de disfunção neurológica conhecida como EAS, que pode ser reversível ou persistir ao longo da vida, cujo os mecanismos envolvidos ainda são desconhecidos. A EAS e a DA parecem compartilhar semelhanças fisiopatológicas. Há estudos com camundongos utilizados como modelo experimental da sepse que relatam um quadro de resistência a insulina, com aumento dos níveis de TNF- α , ativação de GSK3 β e aumento de fosforilação da proteína tau no cérebro destes roedores. (FIGUEIREDO *et al.*, 2016). Os elevados níveis de TNF- α no cérebro tem sido relacionado com prejuízos cognitivos em diversas doenças neurodegenerativas. Outro marco patológico da DA, consiste no acúmulo do peptídeo beta-amilóide no cérebro, e um aumento progressivo dos níveis desse peptídeo também foi observado em animais sobreviventes da sepse, onde o acúmulo de tal peptídeo, associa-se com o prejuízo cognitivo tardio presente nesses animais (SCHWALM *et al.*, 2013). Usando o modelo experimental de sepse CLP, mostramos que animais sobreviventes da sepse que receberam uma injeção ICV de uma dose não tóxica de A β O₄₂ apresentam prejuízo cognitivo 45 dias após a cirurgia, sugerindo que animais que sobrevivem à sepse poderiam se tornar mais sensíveis ao acúmulo desse peptídeo. Em seguida, investigamos a expressão do gene TNF- α nesses animais, e interessante observamos uma tendência na elevação da expressão desse gene. Dois achados também vistos em modelos de DA.

Os oligômeros de beta-amilóide exercem múltiplas ações neurotóxicas que inclui a ruptura da homeostase de cálcio e liberação anormal de cálcio pelo RE, (FELICE *et al.*, 2007) condições conhecidas por favorecer o desenvolvimento do estresse do RE em tecidos periféricos (HOTAMISLIGIL, 2010). O estresse do RE tem um papel importante em algumas desordens metabólicas, como diabetes tipo 2 e obesidade,

estando de alguma forma ligado a resistência de insulina e à inflamação (OZCAN *et al.*, 2006), e níveis elevados de marcadores do estresse do RE, tem sido reportado no cérebro na DA. Estudos mostram que A β Os estimulam marcadores de estresse do RE nos neurônios de camundongos no modelo da DA (LOURENÇO *et al.*, 2013) e que o estresse do RE está associado à sinalização pró-inflamatória de TNF- α nos distúrbios metabólicos (OZCAN *et al.*, 2006; STEINBERG *et al.*, 2006). A perda sináptica e prejuízo de memória também foi observado em modelo animal através da ativação da via TNF- α /PKR/eIF2a (LOURENÇO *et al.*, 2013). Dessa forma, decidimos pesquisar o envolvimento do estresse do RE nos animais sobreviventes da sepse que receberam a dose não-tóxica de beta-amiloide (1pmol), verificando a expressão de alguns genes que participam das vias de sinalização da UPR.

Nós identificamos que animais que sobrevivem à sepse e recebem a injeção de A β 1pmol tendem a expressar níveis mais elevados do gene XBP1s. Esse fator de transcrição em conjunto com outros fatores participa ativamente na síntese de chaperonas e ativação da ERAD, garantindo a diminuição do estresse do retículo e retorno da homeostasia celular. Analisamos também os níveis dos genes ATF4 e CHOP, mas nesses animais e nessas condições, não encontramos qualquer alteração na expressão desses genes. Esses achados sugerem que a sepse possa estar desencadeando o estresse do RE no cérebro dos animais sobreviventes, e que esse evento possa estar associado à maior susceptibilidade aparente ao peptídeo beta-amilóide nesses animais ocasionando prejuízos de memória. Acreditamos que o processo inflamatório gerado pela sepse possa disparar uma via de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR), modificando genes envolvidos neste processo.

6. CONCLUSÃO

Os casos de pacientes hospitalizados em UTIs que desenvolvem a sepse tem assumido grandes proporções nos últimos anos onde metade dos casos, aproximadamente, vão à óbito. Diante da resistividade peculiar a cada indivíduo, há aqueles que sobrevivem a esta intensa inflamação, mas ao contrário do que se imaginaria quanto a cura definitiva, tem-se visto que os pacientes apresentam sequelas a se manifestarem a longo prazo, caracterizando a EAS, que pela fisiopatologia, assimila-se a doença de Alzheimer cuja causa pode estar envolvida com o estresse do retículo endoplasmático. Neste trabalho sugerimos que os animais sobreviventes da sepse ao receberem um insulto como uma quantidade não tóxica de A β O 1 pmol, poderiam estar mais susceptíveis aos prejuízos cognitivos a longo prazo observados nos sobreviventes da sepse, e que este prejuízo poderia estar relacionado com a ativação da UPR. Nossos experimentos mostraram que os animais sobreviventes da sepse que recebem esse insulto de fato demonstram uma sensibilidade maior aos peptídeos Beta-amilóide, estando mais susceptíveis à sequela neurológica desencadeada pela sepse. Os danos cognitivos foram constatados pelo teste de reconhecimento de objetos, onde o grupo sobrevivente da sepse que recebeu o insulto foi incapaz de reconhecer o objeto novo exposto. Estudos revelam que o acúmulo de proteínas pode levar o retículo endoplasmático à uma condição de estresse, e que isso poderia prejudicar ainda mais o acúmulo dessas proteínas. Por outro lado, essa perturbação no sistema ativaria um mecanismo de reparo chamado UPR, objetivando corrigir as falhas no sistema. Alguns genes de transcrição como o XBP-1 estão superexpressos durante o ERE e no nosso estudo vimos uma tendência de aumento na expressão desse fator de transcrição. No entanto, devido ao pequeno número de animais, nosso estudo não apresentou diferenças estatísticas para que pudéssemos inferir a participação do ERE nos prejuízos cognitivos dos animais sobreviventes da sepse. Portanto, faz-se necessário a continuidade destes estudos para que possamos contribuir efetivamente no entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na encefalopatia associada a sepse e identificar novos alvos preventivos e/ou terapêuticos para essa devastadora doença que atinge milhões de indivíduos no mundo.

7. REFERÊNCIAS

AMERI, K. & HARRIS, A. L.,. Activating transcription factor 4. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* . p. 14-21. 2008.

ALAVEZ, S. & LITHGOW, G. J.,. Pharmacological maintenance of protein homeostasis could postpone age-related disease. *Aging Cel*. p. 187-191. 2012

Atlas de Genética e Citogenética em Oncologia e Hematologia. Disponível em: < <http://atlasgeneticsoncology.org/index.html> >. Acesso em: Julho 2018.

BAKER, C.C. , *et al.*,. Evaluation of factors affecting the mortality rate after sepsis in a model of murine cecal ligation and puncture. *Surgery*. p. 331–335. 1983.

BALOSSO, S., *et al.*,. A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1beta. *Brain Research*. p. 3256–3265. 2008.

Bel Marra Health . Disponível em:< <http://www.belmarrahealth.com/sepsis-bacteremia-and-the-risk-of-septic-shock-life-threatening-low-blood-pressure/>>. Acesso em Maio 2018.

BENJAMIM, C. F.,. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. Simpósio: Medicina Intensiva. p. 18-26. 2001.

BERHE, G. V. D., *et al.*,. Intensive insulin therapy in critically ill patients. *The New England Journal of Medicine*. p. 1359–1367. 2001.

BIFF, D., *et al.*,. Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. *The Shock Society*. p.1-4. 2013.

BIRKENFELD, A. L., *et al.*,. Deletion of the Mammalian INDY Homolog Mimics Aspects of Dietary Restriction and Protects against Adiposity and Insulin Resistance in Mice. *Cell Metabolism*. p. 184-195. 2011.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. *American College of Physicians*. p. 3-13. 1991.

BONGARD, F.S. & SUE DY. Current critical care diagnosis & treatment. Appleton & Lange, Connecticut. p. 131-155. 1994.

BOZZA, F. A., *et al.*,. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. p. 1-10. 2013.

CAMMAROTA, M., *et al.* .. Gastrin-releasing Peptide Receptor Antagonist Effects on an Animal Model of Sepsis. American journal of respiratory and critical care medicine. p. 84-173. 2005.

CUNNINGHAMA, J. P., *et al.*,. Methods for estimating neural firing rates, and their application to brain-machine interfaces. Neural Networks. p. 1235-1246. 2009.

CZURA, C. J., & TRACEY, K. J. Autonomic neural regulation of immunity. J Intern Med. p. 66- 156. 2005.

DAL, F. P., *et al.*,. Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis. Neurochemical Research. p.1-12. 2009.

DARNELL, J. C., *et al.*,. FMRP Stalls Ribosomal Translocation on mRNAs Linked to Synaptic Function and Autism. Cell. p. 247–261. 2011.

DAVIES, C. D.,. BBB breakdown in sepsis and tumours. Blood-brain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumours. J. Anat. p.639-646. 2002.

DICKSON, D. W, *et al.*,. Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. Wiley-Liss. p.75–83.1993.

FALCO, A., *et al.*,. Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. Química Nova. p.1-18. 2015.

FIGUEIREDO, C. P., *et al.*, Brain-Defective Insulin Signaling Is Associated to Late Cognitive Impairment in Post-Septic Mice. *Molecular Neurobiology*. p.1-10 2016.

FELICE, F. G. F., *et al.*, Molecular Basis of Cell and Developmental Biology: A β Oligomers Induce Neuronal Oxidative Stress through an N-Methyl-D-aspartate Receptor-dependent Mechanism That Is Blocked by the Alzheimer Drug Memantine. *The journal of biological chemistry*. p.1-13. 2007.

GRABER, T. E. & HOLCIK, M., Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis. *Mol. Bio Syst*. p. 1-10. 2007.

GRAFF, A., *et al.*, Novel insights into the unfolded protein response using *Pichia pastoris* specific DNA microarrays. *BMC Genomics*. p. 1-13. 2008.

GOECKELER, J. L. & BRODSKY, J. L., Molecular chaperones and substrate ubiquitination control the efficiency of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. p. 32-38. 2010.

GOLD, P.E., The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavior Neural Biology*. p. 87-98. 1986.

HETZ, C. & SAXENA, S., ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nature Reviews Neurology*. p. 477-491. 2017.

HOEFFER, C. A. & KLANN, E., mTOR signaling: At the crossroads of plasticity, memory and disease. *Cell Press*. p. 1-9. 2010.

HOLLIEN, J., *et al.*, Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *JCB Reports*. p. 323-331. 2009.

HOLMES, C., *et al.*, Citocinas pro-inflamatórias, comportamento de doença e doença de alzheimer. *American Academy of Neurology*. p. 212-218. 2011.

HOTAMISLIGIL, G. S., Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*. p. 900-917. 2010.

HULL, M., *et al.*, The participation of interleukin-6 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Behavioral Brain Research*. p. 37-41. 1996.

IWASHYNA, T.J., *et al.*, Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *The Journal of the American Medical Association*. p. 1787-1794. 2010.

IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H., Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology Learning Memory*. p. 285-316. 1997.

JACKSON, R. J., HELLEN, C. U. T. & PESTOVA, T. V., The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Molecular cell Biology*. p. 1-15. 2010.

JANIG, W. & GREEN, P. G. Acute inflammation in the joint: its control by the sympathetic nervous system and by neuroendocrine system, *Auton. Neurosci*. p. 42-54. 2014.

JUCIANO, G. , *et al.*, Receptor for advanced glycation end products mediates sepsis-triggered amyloid- β accumulation, tau phosphorylation, and cognitive impairment. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. p. 1-33. 2017.

JUNIOR, J. A. L. S., *et al.*, Grupo de Estudo de Sepsis do Fundo AMIB13, LUIZ, R. R. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. p. 1-9. 2006

KIMBALL, S.R. & JEFFERSON, L. S., Control of Translation Initiation through Integration of Signals Generated by Hormones, Nutrients, and Exercise. *JBC Papers*. p. 1-7. 2010.

KITAZAWA, T., OKUGAWA, S. & OTA, Y., Janus kinase 2 is involved in lipopolysaccharide induced activation of macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol*. p. 399-408. 2003.

KLEIZEN, B. & BRAAKMAN, I., Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Science direct*. p. 343-349. 2004.

KRSTIC, D., *et al.*, Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *Journal of neuroinflammation* p. 2-24. 2012.

KURTZ, Pedro Martins Pereira. Encefalopatia associada a sepse: Fisiopatologia na sepse experimental com avaliação por monitorização multimodal e estudo observacional na sepse clínica (estudo SAE). 2016. f.104. Tese (Doutorado em Pesquisa clínica em doenças infecciosas, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ).

LEE, S., *et al.*, *Drosophila* short neuropeptide F signalling regulates growth by ERK-mediated insulin signalling. p. 1-15. 2008.

LI, G., *et al.*, Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Journal of Cell Biology*. p. 783-79. 2009.

LOURENÇO, M. V., *et al.*, TNF- α Mediates PKR-Dependent Memory Impairment and Brain IRS-1 Inhibition Induced by Alzheimer's b-Amyloid Oligomers in Mice and Monkeys. *Cell Metabolism*. p. 1-13. 2013.

MABB, A. M. & EHLERS, M. D., Ubiquitination in Postsynaptic Function and Plasticity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. p. 179-210. 2010.

MEUSSER, B., *et al.*, ERAD: the long road to destruction . *Nature Cell Biology*. p. 766-772. 2005.

MOSES, H.L., *et al.*, Financial anatomy of biomedical research. *Journal of the American Medical Association*. p.1333-1342. 2005.

MRAVEC, B. The role of the vagus nerve in stroke. *AutonNeurosci*. p. 8-12. 2010.

NEERA, C. & DUGGAL, A. K. Review Article, Sepsis Associated Encephalopathy. p.1-17. 2014.

NIEDERREITER, L., *et al.*, ER stress transcription factor Xbp1 suppresses intestinal tumorigenesis and directs intestinal stem cells. *Journal of experimental medicine*. p. 1-16. 2013.

OKADA, T., *et al.*, Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochemical Society*. p. 585-594. 2002.

OZCAN, U., *et al.*, Chemical Chaperones Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Scientific Reports*. p. 1137-1140. 2006.

PARRILO, J. E., Pathogenetic mechanisms of septic shock. *The New England Journal of Medicine*. p. 1471-1477. 1993.

PIAZZA, O. & COTENA, S., Sepsis associated encephalopathy. *Università degli Studi di Salerno*. p. 20-27. 2012.

POLITO, A., *et al.*, Pattern of Brain Injury in the Acute Setting of Human Septic Shock. *Critical Care*. p.1-9. 2013.

POTT-GODOY, M. C., *et al.*, Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. *Brain Research*. p.1880-1894. 2008.

RÉA, A. N., Fisiopatologia e manifestações clínicas da sepse. *Clín.Bras.Med Intensiva*. p. 1-9. 1996.

RELTON, J. K. & ROTHWELL, N. J., Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res*. p.243-246. 1992.

RUTKOWSKI, D. T. & KAUFMAN, R. J.,. A trip to the ER: coping with stress. *Cell Biology*. p. 20-28. 2004.

RUTKOWSKI, D. T. & KAUFMAN, R. J.,. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Biochemical Sciences*. p. 469-476. 2007.

RYAN, G. J. & HARDY, Y.,. Liraglutide: once-daily GLP-1 agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. p. 260–274. 2011.

SCHWALM, M. T., *et al.*,. Acute Brain Inflammation and Oxidative Damage Are Related to Long-Term Cognitive Deficits and Markers of Neurodegeneration in Sepsis-Survivor Rats. *Molecular Neurobiology*. p. 1-6. 2013.

SEMMLER, A., *et al.*,. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*,. p. 62–70. 2012.

SERRANO, A.P., *et al.*,. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. p. 1-24. 2011.

SHENG, Z.Y. & YAO, Y.M.,. Modern opinions on signal transduction in sepsis. *Chin Crit Care Med*. p.3-6. 2003.

SHOKO, H. & SAIDO, T. C.,. Critical review: involvement of endoplasmic reticulum stress in the aetiology of Alzheimer's disease. *Open biology*. p.1-15. 2018.

SILVA, E., *et al.*,. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). p.1-9. 2004.

STEINBERG, G. R., *et al.*,. Tumor necrosis factor α -induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *CELL METABOLISM*. p. 465-474. 2006.

SUDHEIMER, K.D, *et al.*,. Cortisol, citocinas e interações de volume do hipocampo em idosos frente envelhecimento. *Neurociências*. p. 6-153. 2014.

VEREKER, E., *et al.*,. Evidence that interleukin-1beta and reactive oxygen species production play a pivotal role in stress-induced impairment of LTP in the rat dentate gyrus. *European Journal Neuroscience*. p.1809–1819. 2001.

VEZZANI, A., *et al.*,. IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. *Brain Behavior*. p. 1281–1289. 2011.

VIANA, R., MACHADO, F. & SOUZA, J.,. Sepsis, um problema de saúde pública: a atuação e colaboração da enfermagem na rápida identificação e tratamento da doença. p.1-65. 2017.

VINCENT, J. L., *et al.*, The problem of sepsis: An expert report of the European Society of Intensive Care Medicine. p. 300-304. 1996.

TARKOWSKI, E., *et al.*,. inflamação intratecal precede o desenvolvimento da doença de Alzheimer. *The Journal of Neuroscience*. p. 1200–1205. 2003.

THIJS, L.G. & HACK, C. E. Time course of cytokine levels in sepsis. *Intensive Care Med*. p. 1-6. 1995.

TINTO, S. C., *et al.*,. The ER stress factor XBP1s prevents amyloid-b neurotoxicity. *Human Molecular Genetics*. p. 1-17. 2011.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. *Nature*. p. 420- 853. 2002.

TSURU, A., *et al.*,. Novel mechanism of enhancing IRE1 α -XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway. *Scientific Reports-Nature*. p. 1-8. 2016.

WALTER, P. & RON, D.,. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science*. p. 1081- 1086. 2011.

WANG,S. & KAUFMAN, R. J.,. The impact of the unfolded protein response on human disease. *The journal of Cell Biology*. p. 1-11. 2012.

WEISS, Y.G., GOODMAN, S. & SPRUNG, C. L.,.Steroid Terapy of Septic shock. p.825-834. 2009.

WICHTERMAN, K. A., BAUE , A. E. H. & CHAUDRY, R. H.,. Sepsis and Septic Shock -A Review of Laboratory Models and a Proposal. *Journal of Surgical Research*. p. 189-201. 1980.

WIDMANN, C. N. & HENEKA, M. T. Long-term cerebral consequences of sepsis. *The Lancet Neurology*. p 1-7. 2014.

WILSON, J. X., & YOUNG, G. B. Progress in clinical neurosciences: sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts. *Neurol. J. Southeast Asia*. p. 65–76. 2003.

YOSHIDA, H., *et al.*,. XBP1 is Critical to Protect Cells from Endoplasmic Reticulum Stress: Evidence from Site-2 Protease-deficient Chinese Hamster Ovary Cells . *Japan Society for Cell Biology*. p. 117-125. 2006.