



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

GRACIELA FREITAS ZARBATO

**ESTUDO DO EFEITO DE DIMETIL FUMARATO SOBRE A DISFUNÇÃO
CEREBRAL APÓS SEPSE EXPERIMENTAL EM RATOS**

Tubarão

2016

GRACIELA FREITAS ZARBATO

**ESTUDO DO EFEITO DE DIMETIL FUMARATO SOBRE A DISFUNÇÃO
CEREBRAL APÓS SEPSE EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Fabricia Petronilho, Dra.

Tubarão
2016

Zarbato, Graciela Freitas, 1984-
Z39 Estudo do efeito de dimetil fumarato sobre a disfunção cerebral após sepse experimental em ratos / Graciela Freitas Zarbato ; -- 2016.
56 f. il. ; 30 cm

Orientadora : Fabricia Petronilho.
Dissertação (mestrado)–Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2016.
Inclui bibliografias.

1. Sistema nervoso - Doenças. 2. Septicemia. 3. Encéfalo-Doenças. 4. Inflamação. 5. Estresse oxidativo. I. Petronilho, Fabricia. II. Universidade do Sul de Santa Catarina – Mestrado em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.8



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Estudo do efeito de dimetil fumarato sobre a disfunção cerebral após a sepse experimental em ratos

GRACIELA FREITAS ZARBATO

AUTORA

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 12 de dezembro de 2016.

Doutora Fabricia Petronilho (orientador)

Doutora Francieli Silva Vuolo (Avaliador externo-UNESC)

Doutora Jucélia Jeremias Fortunato (avaliador interno)

Professor Doutor Jefferson Traebert

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

Dedico este trabalho a minha mãe Maria das Graças Freitas Zarbato e a minha irmã Silvia Maria Freitas Zarbato Speck. Vocês são as minhas razões de viver!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde e por guiar meus passos na realização desse sonho.

Agradeço a minha família por acreditarem em mim e me apoiarem sempre: minha mãe, Maria das Graças Freitas Zarbato; minha irmã, Sílvia Maria Freitas Zarbato; minha sobrinha, Sofia Zarbato Speck; meu sobrinho, Enzo Zarbato Speck; meu cunhado, João Geraldo Speck Júnior; meu namorado Donald Willians Cardoso Serafim. Amo vocês!

Agradeço a minha querida orientadora, Fabricia Cardoso Petronilho, pela orientação e ensinamentos. Você é exemplo de ética, generosidade e inteligência. Obrigada por tudo.

Agradeço a minha equipe do grupo de Pesquisa em Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos (Neuroimet) pela amizade e aprendizado: Lucinéia Gainski Danielski, Mariana Goldim, Amanda Della Giustina, Aloir Oliveira Júnior, Leandro Garbossa, Maria Eduarda Fileti, Khiany Mathias, Diego Nascimento, Maryane Modolon, Martins Back, Raquel Jaconi De Carli, Simone Davet, Judite Filgueiras Rodrigues. Vocês são especiais!

Agradeço aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, do campus de Tubarão-SC, por todo o aprendizado: Jucélia Jeremias Fortunato, Fabiana Schuelter Trevisol, Daisson José Trevisol, Claudio Damaceno, Luiz Alberto Kanis, Josiane Somariva Prophiro, Gislaine Tezza Rezin, Jefferson Ricardo Pereira.

Agradeço aos meus amigos de turma pela união durante todo o período de estudos: Roberto Gaspari Beck, Leonardo De Paula Martins, Diego Anacleto, Everson Silva, Mariana Goldim, Fabiana Durante de Medeiros, Alessandra De Sá Soares, Paulo Martins Fabro. Foi um prazer estudar com vocês!

Agradeço pelo bom atendimento das secretárias do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, do campus Tubarão-SC: Silvane Cauz, Francieli Zimmer e Sarah Morgenstern Pereira.

Agradeço à Unisul por incentivar e permitir o aperfeiçoamento profissional dos profissionais da área da saúde.

RESUMO

Introdução: A sepse é a disfunção de órgãos com potencial risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente à infecção. A sepse é frequentemente associada com a disfunção aguda do Sistema Nervoso Central (SNC) - Encefalopatia Associada à Sepse (EAS), possuindo como principal sinal clínico o nível de consciência alterado. O dimetil fumarato (DMF), tem se mostrado um importante alvo para alterações no SNC decorrentes da resposta inflamatória ou das espécies reativas de oxigênio (EROs). **Objetivo:** avaliar o efeito de DMF sobre a disfunção cerebral após sepse experimental em ratos. **Métodos:** ratos Wistar machos (250-350g) foram submetidos ao modelo CLP, com sham como controle. Os grupos foram divididos em sham+veículo; sham+NAC; sham+DMF; CLP+veículo; CLP+NAC e CLP+DMF. Os animais foram tratados com DMF na dose de (15 mg/kg dissolvido em 0.08% de dimetilsulfóxido em 0 horas e 12 horas após CLP por gavagem) e administração de n-acetilcisteína (NAC) (20mg/kg, 3, 6 e 12 horas após CLP via subcutânea) como controle. Em 24 horas após CLP, nas amostras de córtex, córtex pré-frontal e hipocampo, foram realizadas análises de citocinas, mieloperoxidase (MPO), nitrito/nitrato (N/N), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e dano oxidativo em lipídios e proteínas. Dados analisados por ANOVA e post hoc Tukey com $p < 0.05$. **Resultados:** Verificamos um aumento no nível de citocinas, MPO, N/N, dano oxidativo lipídios e proteínas, e aumento da atividade das enzimas SOD e GPx nas diferentes estruturas estudadas, quando os animais foram submetidos a sepse e, o tratamento com DMF foi efetivo na reversão desses parâmetros. **Conclusão:** O tratamento com DMF foi eficaz em reverter parâmetros relacionados à inflamação e estresse oxidativo no cérebro de ratos submetidos à sepse.

Palavras-chave: Dimetil Fumarato. Encefalopatia associada à sepse. Inflamação.

ABSTRACT

Introduction: Sepsis is dysfunction of organs with life-threatening potential caused by a dysregulated host response to infection. Sepsis is often associated with acute central nervous system (CNS) - Sepsis Associated Encephalopathy (EAS) dysfunction, with the primary level of consciousness being altered. Dimethyl fumarate (DMF) has been shown to be an important target for CNS changes due to inflammatory response or reactive oxygen species (ROS). Objective: to evaluate the effect of DMF on brain dysfunction after experimental sepsis in rats. Methods: Male Wistar rats (250-350g) were submitted to the CLP model, with sham as control. The groups were divided into sham + vehicle; Sham + NAC; Sham + DMF; CLP + vehicle; CLP + NAC and CLP + DMF. The animals were treated with DMF (15 mg/kg dissolved in 0.08% dimethylsulfoxide in 0 hours and 12 hours after CLP per gavage) and administration of n-acetylcysteine (NAC) (20mg/kg, 3, 6 and 12 hours after CLP Via subcutaneous) as control. In the 24 hours after CLP, the cytokines, myeloperoxidase (MPO), nitrite/nitrate (N/N), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) were analyzed in cortex, pre-frontal cortex and hippocampus samples and oxidative damage in lipids and proteins. Data analyzed by ANOVA and Tukey post hoc with $p < 0.05$. Results: We verified an increase in the level of cytokines, MPO, N / N, oxidative damage lipids and proteins, and increased activity of SOD and GPx enzymes in the different structures studied, when the animals were submitted to sepsis and treatment with DMF was effective in reversion These parameters. Conclusion: DMF treatment was effective in reversing parameters related to inflammation and oxidative stress in the brains of rats submitted to sepsis.

Keywords: Dimethyl Fumarate. Encephalopathy associated with sepsis. Inflammation.

LISTAS

Lista de abreviaturas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARE - Elementos de Resposta Antioxidante (do inglês, *Antioxidant Response Element*)

BASES - Estudo Brasileiro de Epidemiologia da Sepsis

BHE - Barreira Hematoencefálica

Bpm - Batimentos Por Minuto

CAT - Catalase

CCL2 - Quimiocina CCL2

CEUA - Comissão de Ética em Uso de Animais

CINC-1 - Quimioatraente-1 de neutrófilos indutor de citocina (do inglês, *Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1*)

CLP - Ligação e Perfuração Cecal (do inglês, *Cecal Ligation and Puncture*)

COX-2 - Ciclo-oxigenase 2

DBCA - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais

DFX - Deferoxamina

DMF - Dimetil Fumarato (do inglês, *Dimethyl Fumarate*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EAS - Encefalopatia Associada à Sepsis

ERNs - Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

E-selectina - Molécula de adesão celular E-selectina (do inglês, *E-selectin*)

EUA - Estados Unidos da América

GPx - Glutathione Peroxidase

ICAM-1 - Molécula de Adesão Intracelular 1 (do inglês, *Intercellular Adhesion Molecule-1*)

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-2 - Interleucina 2

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

INOS - Óxido Nítrico Sintase Induzível (do inglês, *Inducible Nitric Oxide Synthase*)

lpm - Inspirações Por Minuto

LPS - Lipopolissacarídeo

MDA - Malondialdeído

MMF - Monometil Fumarato (do inglês, *Monomethyl Fumarate*)

MmHg - Milímetros de mercúrio

MMP-2 - Metaloproteinase-2

MMP-9 - Metaloproteinase-9

MMPs - Metaloproteinases

MPO - Mieloperoxidase

NAC - N-acetilcisteína

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (do inglês, *Nicotinamide Adenine Nucleotide Phosphate*)

NF- κ B - Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (do inglês, *Nuclear Transcription Factor-kappa B*)

NO - Óxido nítrico (do inglês *Nitric Oxide*)

Nrf2 - Fator de Transcrição Nuclear derivado de eritroides-2 (do inglês, *Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2*)

O₂⁻ - Ânion Superóxido

ONOO⁻ - Peroxinitrito

PA - Pressão Arterial

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

RRPs - Receptores de Reconhecimento Padrão

SIRS - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD - Superóxido Dismutase

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

TLR - Receptor toll-like (do inglês, *Toll-like Receptors*)

TLR-2 - Receptor toll-like 2 (do inglês, *Toll-like Receptors 2*)

TLR-4 - Receptor toll-like 4 (do inglês, *Toll-like Receptors 4*)

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α (do inglês, *Tumor Necrosis Fator α*)

UTIs - Unidades de Terapia Intensiva

VCAM-1 - Molécula de Adesão Vascular (do inglês, *Vascular Cell Adhesion Protein 1*)

Lista de quadros

Quadro 1 - Variáveis do estudo.....	31
-------------------------------------	----

Lista de figuras

Figura 1 - Tratamentos realizados nos grupos experimentais (CLP) e controles (Sham)	27
Figura 2 - Infiltrado de neutrófilos através da análise da atividade da MPO no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com DMF e NAC.	33
Figura 3 - Níveis de citocinas pró-inflamatórias CINC-1 (A), TNF- α (B) e IL-6 (C) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com DMF e NAC.	34
Figura 4 - Nível de N/N no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com DMF e NAC.....	35
Figura 5 - Níveis de dano oxidativo em lipídios (A) e proteínas (B) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com DMF e NAC	36
Figura 6 - Níveis da atividade da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com DMF e NAC	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.1.1 Sepses.....	14
1.1.2 Epidemiologia da sepsis no Brasil e no Mundo	15
1.1.3 Fisiopatologia da disfunção cerebral na sepsis	16
1.1.3.1 Envolvimento de mediadores pró-inflamatórios na sepsis	17
1.1.3.2 Estresse oxidativo na sepsis.....	19
1.1.4 Dimetil fumarato	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. METODOLOGIA	25
3.1 TIPO DE ESTUDO	25
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	25
3.3 ANIMAIS.....	26
3.4 INDUÇÃO DE SEPSIS	26
3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO	26
3.6 TÉCNICAS	28
3.6.1 Atividade da mieloperoxidase.....	28
3.6.2 Níveis de citocinas	28
3.6.3 Concentração total de nitrito/nitrato.....	28
3.6.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	29
3.6.5 Carbonilação protéica.....	29
3.6.6 Atividade de enzimas antioxidantes	29
3.6.7 Determinação de proteínas totais.....	30
3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	31
3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	32
3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	32
4. RESULTADOS	33
4.1 O DMF REDUZ A NEUROINFLAMAÇÃO NA SEPSIS	33

4.2 O DMF REDUZ OS NÍVEIS CEREBRAIS DE ESTRESSE OXIDATIVO NA SEPSE	35
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	42
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO	54
ANEXO A - Parecer Aprovação da Comissão de Ética em Uso de Animais	54

1. INTRODUÇÃO

A sepse e suas consequências constituem as causas mais comuns de mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs)¹. Pode ser representada por um subgrupo da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) onde ocorre a presença de infecção². Em casos mais graves, quando o choque séptico se instala, com hipotensão arterial de difícil controle, este estado pode progredir para falência múltipla de órgãos e sistemas³.

A sepse é frequentemente associada com a disfunção aguda do Sistema Nervoso Central (SNC) - Encefalopatia Associada à Sepse (EAS), possuindo como principal sinal clínico o nível de consciência alterado que vai desde confusão a delírio, obnubilação e evolução a coma⁴. Em longo prazo, verificam-se alterações cognitivas como o déficit de memória⁴.

Mesmo que alguns dos mecanismos fisiopatológicos básicos já tenham sido esclarecidos, as alterações agudas verificadas na EAS, além do dano cognitivo em longo prazo, têm sido alvo de estudo para pesquisadores da área, com a busca de possibilidades para pesquisas que atuem nesses processos^{5,6}. Neste contexto, a utilização de modelos animais de sepse revela-se útil no avanço do conhecimento da fisiopatologia da doença para delinear novos alvos terapêuticos⁷. Além disso, o modelo animal de sepse abdominal polimicrobiana através de ligação e perfuração cecal (CLP), torna-se um modelo animal de sepse relevante do ponto de vista clínico, por mimetizar diversos aspectos da sepse pela peritonite em humanos⁸.

Utilizando o modelo de sepse abdominal polimicrobiana induzido por CLP⁹, foi observado aumento de dano oxidativo e mediadores inflamatórios no hipocampo dos animais em 0 a 96 horas após a indução de sepse² e, além disso, um aumento da migração de neutrófilos para o SNC e quebra da barreira hematoencefálica (BHE) em 24 horas após a indução da sepse³. Tais observações agudas do modelo CLP correlacionam-se com alterações cerebrais em longo prazo, como o dano em memória, alterações de neurotrofinas e aumento de marcadores de neurodegeneração¹⁰⁻¹³.

Considerando que a neuroinflamação e o estresse oxidativo podem ocasionar alterações cerebrais na sepse, são necessárias alternativas terapêuticas para o tratamento dessa condição¹⁴.

Por tais aspectos, o dimetil fumarato (DMF), um éster do ácido fumárico, tem se mostrado um importante alvo para alterações no SNC decorrentes da resposta inflamatória ou da ação de espécies reativas de oxigênio (EROs)^{15,16}. Dentro de minutos após a ingestão oral, o DMF é rapidamente hidrolisado por esterases no interior do intestino delgado, para formar o seu metabólito biologicamente ativo, o monometil fumarato (MMF)¹⁷. O MMF é metabolizado através do ciclo do ácido tricarboxílico para formar H₂O e dióxido de carbono, o qual é excretado através da respiração¹⁸.

Trabalhos têm demonstrado o efeito de DMF sobre a ativação de fator de transcrição nuclear derivado de eritroides (Nrf2), responsável pela elevação dos níveis endógenos de enzimas antioxidantes, como a glutathiona peroxidase (GPx)^{19,20}. Ainda, estudos *in vitro* mostraram efeito anti-inflamatório do DMF, representado pela redução da produção de citocinas, entre elas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6) e, conseqüentemente, atenuação da expressão de moléculas de adesão celular como a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1), a molécula de adesão celular E-selectina e molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) como resultado da inibição da ativação do fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB)^{21,22}.

Sabendo que diferentes estudos mostram que o dano cerebral decorrente da sepse pode estar associado a mecanismos exercidos pela inibição da via Nrf2 e ativação de NF-kB que respectivamente, resultam na diminuição de antioxidantes e aumento de mediadores pró-inflamatórios²³⁻²⁶, investigação do potencial terapêutico de DMF na disfunção cerebral aguda e em longo prazo decorrente da sepse, bem como os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, pode ser de extrema importância, visto que o DMF atua especificamente nessas duas vias.

Por todos os aspectos levantados e sabendo que não existem dados que relacionem os efeitos de DMF sobre o dano cerebral na sepse, mas considerando que a neuroinflamação e o estresse oxidativo são apontados como mecanismos da doença, possuímos como hipótese que o mesmo possa ter efeito protetor contra tais alterações.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Sepses

Para compreender a sepsis e auxiliar o diagnóstico precoce durante a prática clínica, buscou-se uniformizar suas definições e evoluções. A conferência realizada pelo *American College of Chest Physicians e a Society of Critical Care Medicine*, em agosto de 1991, estabeleceu as seguintes definições²⁷.

- **Infecção:** fenômeno microbiano, caracterizado por uma resposta inflamatória à presença de micro-organismos ou à invasão de tecidos normalmente estéreis por estes organismos;
- **Bacteremia:** presença de bactérias viáveis na corrente sanguínea;
- **Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS):** uma série de insultos pode gerar um estado orgânico inflamatório, incluindo politrauma, pós-operatório, pancreatite, queimaduras e infecções. A SIRS é a manifestação clínica desse fenômeno e foi definida como a presença de dois ou mais dos seguintes critérios: temperatura corporal $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$, frequência cardíaca >90 bpm, frequência respiratória <20 ipm ou $\text{PaCO}_2 <32\text{mmHg}$, leucograma com >12.000 ou <4.000 células/ mm^3 ou ainda $>10\%$ de neutrófilos imaturos.
- **Sepsis:** SIRS desencadeada por infecção (documentada ou suspeita).
- **Sepsis grave:** sepsis associada com disfunção orgânica, hipotensão ou sinais de hipoperfusão. A hipotensão é definida como pressão arterial (PA) sistólica <90 mmHg ou queda >40 mmHg do basal na ausência de outras causas. As disfunções orgânicas incluem hipoxemia, insuficiência renal aguda/crônica, coagulopatia, plaquetopenia, íleo parálitico e hiperbilirrubinemia.
- **Choque séptico:** hipotensão mantida ou necessidade de inotrópicos-vasopressores, a despeito de ressuscitação volêmica adequada, associados a sinais de hipoperfusão orgânica (ex.: hiperlactemia, rebaixamento do nível de consciência, oligúria);
- **Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos:** presença de disfunções orgânicas que impedem a manutenção da homeostase sem intervenção.

No início de 2016, através de um novo consenso, foi publicada uma nova definição para a sepse. A sepse passou a ser definida como a disfunção de órgãos com potencial risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente à infecção²⁸. Em outras palavras, a sepse passa a ser definida como um processo infeccioso com a presença de disfunção orgânica. Com a nova definição, extinguiu-se a nomenclatura sepse grave, que identificava a sepse associada à disfunção orgânica, mantendo-se apenas os termos sepse e choque séptico, este último utilizado quando há hipotensão refratária a reposição volêmica e uso de vasopressores²⁸.

Associado a isso, recomendou-se diagnosticar a disfunção orgânica através do escore quick-SOFA, que é a medida sequencial rápida de falências orgânicas, que analisa frequência respiratória, pressão sanguínea sistólica e alterações do estado mental²⁸. A disfunção orgânica é característica acentuada da sepse, e quanto maior o número de órgãos em falência pior o prognóstico do paciente, em que cada órgão em disfunção representa um acréscimo de 15-20% na mortalidade²⁹.

Apesar dos importantes avanços da medicina, a sepse não tem diminuído nos últimos anos. Isto está relacionado a um aumento da incidência de forma contínua, como um resultado do envelhecimento da população, um aumento constante nas intervenções cirúrgicas e das resistências a antibióticos³⁰.

1.1.2 Epidemiologia da sepse no Brasil e no Mundo

A sepse é uma doença geradora de altos custos para os serviços de saúde. O custo anual de prestação de cuidados a pacientes sépticos é aproximadamente US\$ 24 bilhões nos Estados Unidos (EUA)³¹. A incidência de sepse grave nos EUA é estimada em 300 casos por 100.000 habitantes. Cerca de metade desses casos ocorrem fora da UTI. A perspectiva é que 1/4 dos pacientes que desenvolvem sepse grave irá a óbito durante a internação³².

No Japão, um estudo avaliou as características, tratamentos e resultados de 3195 pacientes com sepse grave, de 42 UTIs em todo o país³³. Destes pacientes, constatou-se 2111 sem choque séptico e 1084 pacientes com choque séptico. As taxas de sobrevivência avaliadas em 28 e 90 dias após a admissão na UTI foram de 73,6% e 56,3%, respectivamente³³.

Um estudo observacional, prospectivo, foi realizado ao longo de seis anos (de 1 janeiro de 2008 a 31 de dezembro de 2013) na UTI do Hospital Universitário de Donostia (San Sebastián, Espanha) que atende uma população total de 700.000 habitantes³⁴. Nestes seis anos, verificou-se um aumento progressivo do número de pacientes com sepse admitidos no hospital. No total, 1136 pacientes apresentavam sepse grave ou choque séptico no momento da admissão, ou durante a permanência na UTI³⁴. No nordeste da Itália (em Veneto), no período de 2008 a 2013, um estudo determinou as taxas de mortalidade por sepse, apresentando no geral, 16.906 mortes³⁵.

No Brasil, o estudo BASES (Estudo Brasileiro de Epidemiologia da Sepse), realizado em cinco UTIs brasileiras, encontrou taxas de mortalidade de 11%, 33,9%, 46,9% e 52,2%, respectivamente, em pacientes com SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico³⁶. Segundo dados ainda do estudo BASES, a doença é a principal geradora de custos nos setores público e privado, devido à necessidade de utilizar equipamentos sofisticados, medicamentos caros e exigir muito trabalho da equipe médica³⁶. Outro estudo nacional analisou dados de 75 UTIs em regiões diferentes e encontrou taxas de mortalidade de 16,7% para sepse, 34% para sepse grave e 65,3% para choque séptico³⁷.

Nessa perspectiva, as alterações cerebrais na sepse contribuem para o aumento da mortalidade e permanência na UTI³⁸⁻⁴⁰. Quando sobrevivem, após a alta hospitalar, os pacientes apresentam deficiências cognitivas e funcionais com redução da qualidade de vida e perda da capacidade produtiva³⁸⁻⁴⁰. Por tais aspectos, torna-se essencial a investigação dos mecanismos fisiopatológicos que ligam a inflamação sistêmica verificada na sepse decorrente da infecção, às alterações cerebrais agudas e também em longo prazo³⁸⁻⁴⁰.

1.1.3 Fisiopatologia da disfunção cerebral na sepse

A inflamação é uma resposta normal do hospedeiro contra agentes infecciosos^{41,42}. Na sepse, ocorre a resposta inflamatória que é caracterizada pela produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios e pela excessiva ativação de células inflamatórias, resultando no que conhecemos como disfunção orgânica na sepse^{41,42}. Entre as disfunções orgânicas associadas à sepse e ao choque séptico, a

disfunção cerebral aguda/EAS, instala-se precocemente e, com frequência, é pouco diagnosticada^{41,42}.

A EAS, também chamada por alguns autores de *delirium* associado à sepse, é caracterizada por início agudo de comprometimento da função cognitiva, que pode variar entre lentidão do pensamento, desorientação, agitação, até torpor e coma⁴³. São critérios de exclusão a demonstração de ausência de lesão cerebral primária, como meningite/encefalite, trauma crônico, acidente vascular cerebral isquêmico e hemorrágico, alteração metabólica específica ou efeito colateral de drogas ou medicamentos⁴³. Em análises *post mortem* de indivíduos com sepse, foi demonstrada proliferação de astrócitos e micróglia no córtex, múltiplas hemorragias na substância branca e micro abscessos⁴⁴. Nos sobreviventes, apresentam-se redução do fluxo sanguíneo cerebral, disfunção da BHE, alteração de neurotransmissores⁴⁴ e disfunção cognitiva em longo prazo⁴². Adicionalmente, dados de um estudo pré-clínico de sepse demonstrou que os radicais livres induzem a apoptose neuronal em determinadas regiões do cérebro e, como resultado, podem provocar déficit cognitivo persistindo após a recuperação clínica de sepse¹⁰.

Os mecanismos fisiopatológicos associados ao desenvolvimento da disfunção cerebral na sepse não são bem entendidos. Entretanto, sabe-se que a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, o estresse oxidativo e disfunção energética cerebral estão envolvidos⁴³.

1.1.3.1 Envolvimento de mediadores pró-inflamatórios na sepse

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória, ou seja, um processo biológico envolvendo componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis⁴⁵. A inflamação apresenta como sinais clínicos característicos rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional. A finalidade desse processo é retirar o estímulo indutor da resposta e começar a recuperação do tecido local⁴⁵.

Moléculas tais como lipopolissacarídeo (LPS), resíduos de manose e ácidos teicóicos, comumente encontradas na superfície de micro-organismos, constituem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs)⁴⁶. Os PAMPs estimulam a resposta imune inata, por interação com diferentes receptores conhecidos como

Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs), dentre os quais a família dos receptores *Toll-like* (TLRs)⁴⁶.

Os TLRs se destacam por seu papel central no reconhecimento a patógenos e o começo da resposta inflamatória⁴⁶. O receptor *toll-like* 4 (TLR-4) é conhecido como o principal receptor de reconhecimento de LPS⁴⁷, um componente de organismos gram-negativos, enquanto que o receptor *toll-like* 2 (TLR-2) responde às lipoproteínas a partir de organismos bacterianos gram-positivos⁴⁸, bem como leveduras⁴⁹ e micobactérias⁵⁰. Embora TLR-4 seja um receptor principal para o reconhecimento de LPS, a possibilidade de resposta de TLR-2 ao LPS também foi descrita⁵¹.

Nesse contexto, a endotoxina (LPS) é um indutor crucial na patogênese da sepse gram-negativa³. A detecção de LPS pelas células imunitárias inatas é fundamental para as defesas do hospedeiro contra bactérias gram-negativas⁵².

O organismo está preparado para detectar pequenas quantidades de LPS circulante para combater o foco infeccioso e, como mencionado acima, através do reconhecimento principalmente pelo TLR-4 resultando na ativação de proteínas quinases intracelulares com posterior ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B⁵². O NF- κ B é um fator de transcrição que se mantém inativo no citoplasma e que migra para o núcleo da célula após ser ativado, promovendo a transcrição de diversos genes relacionados à resposta inflamatória aguda, como genes que codificam TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β) e quimiocinas como a interleucina 8 (IL-8)⁵³.

Na sepse, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 ativam células-alvo e incentivam a produção de mediadores pró-inflamatórios, como outras citocinas, quimiocinas, EROs, espécies reativas de nitrogênio (ERNs), eicosanoides e enzimas proteolíticas⁵⁴. No entanto, essa produção de mediadores inflamatórios é excessiva, levando ao dano tecidual e, conseqüentemente, associado à disfunção de microcirculação, e por fim a falência orgânica³.

Em pacientes sobreviventes à sepse, verificou-se um aumento de IL-6 e hipotrofia hipocampal⁵⁵. No que se refere a dados encontrados em estudos pré-clínicos, verificou-se que, em algumas horas após o início da sepse, há conseqüente aumento de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 no SNC^{56,57}.

Uma vez que a inflamação persiste, há um aumento da permeabilidade da BHE, dano oxidativo, alterações importantes no metabolismo energético, ativação

microglial e excitotoxicidade por glutamato, agravando a EAS e contribuindo para a disfunção e a degeneração neuronal^{11,57-59}.

1.1.3.2 Estresse oxidativo na sepse

Na sepse ocorre o estresse oxidativo, um processo que favorece principalmente a inflamação sistêmica e falência de múltiplos órgãos, devido à produção excessiva de radicais livres e diminuição das defesas antioxidantes⁶⁰.

Os radicais livres podem ser definidos como espécies químicas reativas que apresentam um elétron não emparelhado em sua órbita exterior. É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas⁶¹. Eles podem doar um elétron ou aceitar um elétron de outras moléculas, ou seja, podem ser oxidantes ou redutores. Atacam macromoléculas importantes a fim de estabilizar-se, perturbando a homeostase e causando danos e morte celular⁶².

Dentre os radicais livres mais importantes estão: o radical hidroxil, o ânion superóxido, e o peroxinitrito⁶². Eles podem ser gerados pela via enzimática (NADPH oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, ciclooxigenase), pela via não enzimática (reação de Fenton) e durante a atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial⁶³.

Na sepse, sabe-se que ocorrem alterações na estrutura e funções da mitocôndria dependente da ação das EROs, enquanto que a disfunção da mitocôndria também pode agravar a sepse gerando EROs e ERNs⁶⁴. Associado à alteração da função mitocondrial na sepse com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, ocorre a ativação neutrofílica e, entre uma de suas respostas contra a infecção, ocorre a produção aumentada de EROs e ERNs^{3,63,65}. Em concentrações elevadas, tais espécies geram o estresse oxidativo, ou seja, um processo deletério celular a lipídios de membrana, proteínas e DNA⁶⁶. A peroxidação lipídica ocorre, por exemplo, quando o excesso de radicais hidroxil e de peroxinitrito danificam as membranas celulares e das lipoproteínas, conduzindo a formação de malondialdeído (MDA) e compostos conjugados que são citotóxicos e mutagênicos⁶⁷. O dano em proteínas através das EROs e ERNs leva a mudanças estruturais e perda da atividade enzimática⁶⁷. Além disso, o dano oxidativo ao DNA acarreta diferentes

lesões oxidativas que podem causar mutações celulares. Assim, as células aeróbicas podem sofrer dano oxidativo⁶⁷.

O cérebro é particularmente suscetível, pois utiliza altas taxas de oxigênio, quando comparado a outros órgãos⁶⁸. Suas defesas antioxidantes são modestas; as mitocôndrias geram ânion superóxido e as membranas neuronais são ricas em ácidos graxos polinsaturados. Dessa forma, os produtos da lipoperoxidação podem causar dano cerebral⁶⁸.

Estudos experimentais apontam o desenvolvimento de estresse oxidativo e sua relação com a EAS e suas consequências^{69,70}. Foi verificado um aumento no dano oxidativo em proteínas e lipídios no hipocampo, córtex, cerebelo e estriado entre 0 e 96 horas após a indução de sepse polimicrobiana em ratos².

Sabe-se que, perante situações de trauma e/ou infecção, os mecanismos inflamatórios regulados por citocinas ou a ação de EROs permitem que as junções presentes entre as células endoteliais da BHE dissociem-se, diminuindo a proteção às células do SNC, ocorrendo a formação de edema e lesão encefálica, além de perpetuar a resposta inflamatória pela ativação microglial⁷¹. Em um estudo pré-clínico de sepse com ratos submetidos ao modelo CLP, foi verificado que ocorre a quebra da BHE em 24 horas após a sepse e esse evento é seguido do aumento de infiltrado de neutrófilos em diferentes estruturas cerebrais, como o hipocampo e córtex pré-frontal³. Dados mostram que os radicais livres induzem, adicionalmente, à apoptose neuronal no hipocampo e, como resultado, podem provocar déficit cognitivo¹⁰.

Uma vez que a célula é o principal local da produção de radicais livres, ela também apresenta um sistema de defesa, ou seja, contém antioxidantes a fim de minimizar o estresse induzido pelas EROs⁶¹. Este mecanismo é chamado de sistema antioxidante e é composto por defesas endógenas/enzimáticas, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e GPx; e não enzimáticos, como, por exemplo, glutathione e bilirrubina⁶³.

A SOD é um antioxidante enzimático intracelular que catalisa a conversão do ânion superóxido para oxigênio e o peróxido de hidrogênio⁶¹. A CAT é uma enzima presente no peroxissoma de células aeróbicas que ocasiona a conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular⁶¹. Enquanto a GPx é o mais abundante antioxidante mitocondrial, exercendo um papel importante na estabilidade e função

mitocondrial⁶⁴. Um dos papéis da GPx é controlar os níveis de hidroperóxidos lipídicos para evitar danos celulares provenientes do ataque desses radicais⁷².

O fator de transcrição Nrf2 é uma via que regula as defesas antioxidantes. Esta via protege as células contra a inflamação, inibindo lesões nos tecidos, pois é responsável pela elevação dos níveis endógenos de enzimas antioxidantes, tais como a GPx²⁰.

Em condições que promovem o estresse oxidativo, como na sepse, os antioxidantes endógenos podem não ser suficientes para combater os danos celulares causados pelos radicais livres^{72,73}. Para suprir esta necessidade do organismo, terapias antioxidantes exógenas vêm sendo utilizadas, tais como a N-acetilcisteína (NAC), a deferoxamina (DFX) e o selênio^{72,73}.

A NAC é um precursor da GPx e foi verificada como um potente antioxidante em modelo animal de sepse⁶⁴. É um agente terapêutico utilizado há anos na prática clínica para o tratamento da insuficiência hepática devido à superdose de paracetamol⁷⁴. Além disso, em pacientes com quadro de sepse, o tratamento com NAC foi efetivo em suprimir a ativação de neutrófilos e macrófagos e bloqueando a liberação de TNF- α e IL-8⁷⁴.

A administração combinada de NAC com DFX⁷⁵, um quelante de ferro que impede a formação do radical hidroxil, pode atenuar danos oxidativos no hipocampo em 6 horas após a indução de sepse e prevenir o dano em memória^{11,73,76-78}. Além de NAC e DFX, verificou-se que o tratamento antioxidante com selênio foi efetivo na diminuição da disfunção cerebral na sepse experimental por agir na regeneração de GPx⁷⁶.

Embora alguns mecanismos relacionados à fisiopatologia da EAS já tenham sido apresentados, o tratamento e diagnóstico ainda são complexos. Existem opções limitadas para o tratamento da EAS, que se baseiam principalmente no controle dos sintomas, porém ainda não são totalmente eficazes¹⁴. Nessas circunstâncias, a busca de alvos terapêuticos que consigam inibir vias envolvidas na neurobiologia da EAS, como estresse oxidativo e produção exacerbada de mediadores pró-inflamatórios, tem sido de grande interesse para a pesquisa intensivista.

1.1.4 Dimetil fumarato

Ésteres de fumarato, e em particular o DMF, são agentes terapêuticos aprovados para o tratamento de doenças autoimunes, tais como a esclerose múltipla e psoríase⁷⁹. O composto utilizado para tratar pacientes na Europa foi chamado FUMADERM®. FUMADERM® é composto por ésteres de ácido fumárico, incluindo DMF e MMF. Após a administração oral, é sabido que o DMF é hidrolisado formando o MMF e este é considerado seu ingrediente ativo⁸⁰. O MMF é metabolizado pelo ciclo do ácido tricarboxílico para dióxido de carbono, seguindo pelo ácido fumárico, ácido cítrico, glicose e é eliminado como dióxido de carbono⁸¹. Além da ação já comprovada do DMF sobre a esclerose múltipla e psoríase, estudos mostram a efetividade de DMF sobre o dano ao SNC por meio da supressão da resposta inflamatória, estresse oxidativo e injúria neuronal associada à ativação microglial e por sua potencialidade em atravessar a BHE^{15,82-85}.

Em relação à resposta imunomoduladora, a ação de DMF parece estar envolvida com a inibição da função do NF-κB. A via regulada por NF-κB tem função central na regulação da produção de citocinas como IL-1β, TNF-α, IL-6, interleucina 2 (IL-2), indução da expressão da molécula de adesão ICAM-1, além da produção de iNOS e COX-2⁸⁶. No que tange a ação antioxidante de DMF, sua atuação está relacionada com a ativação do fator de transcrição nuclear Nrf2 e, posteriormente, a elementos de resposta antioxidante (ARE)⁸⁷. A resposta regulada por ARE é uma resposta de estresse celular citoprotetora, envolvendo a ativação de múltiplos genes que protegem a célula contra diferentes formas de indução de estresse oxidativo intracelular e injúria⁸⁷. Geralmente, o estresse oxidativo ocorre, quando as células são ineficazes para detoxificar agentes que causam dano ou reparar o dano causado por EROs e ERNs. O processo de estresse oxidativo induz à translocação de Nrf2 para o núcleo, onde se liga a ARE para promover a transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes⁸⁸.

Estudos têm demonstrado a ação regulatória causada por DMF sobre a via que regula Nrf2 e NF-κB^{89,90}. Genes antioxidantes ativados por Nrf2 podem, adicionalmente, inibir a via de NF-κB e assim, indiretamente, modular a sinalização de mediadores pró-inflamatórios^{89,90}. Outros dados ainda reforçam que ocorre um efeito recíproco de NF-κB sobre a função de Nrf2⁹¹. A subunidade p65 de NF-κB tem sido mostrada por suprimir a sinalização a nível transcricional de Nrf2⁹¹. Assim, as

vias Nrf2 e NF- κ B regulam uma à outra através de uma inibição recíproca. Portanto, a combinação da indução de Nrf2 com a inibição da sinalização de NF- κ B por DMF promove um efeito anti-inflamatório, antioxidante, inibindo a infiltração celular⁹¹.

Sobre a ativação celular, tem-se verificado o papel protetor do DMF sobre a ativação demasiada de células endoteliais, macrófagos, micróglia e astrócitos⁸³. Em macrófagos humanos, DMF diminui a translocação de NF- κ B com redução de secreção de TNF- α ¹⁵. Além disso, suprimiu a quimiotaxia de monócitos humanos por diminuir a ação da quimiocina CCL2 e, nesse sentido, diminuindo o infiltrado celular através das células endoteliais⁸⁴.

No que se refere ao SNC, sabe-se que, na sepse, a micróglia ativada, excessivamente, pode aumentar o estresse oxidativo e respostas pró-inflamatórias, danificando os neurônios e resultando em alterações comportamentais⁹². Em cultura microglial exposta a LPS, o DMF diminui a liberação de IL-1 β , IL-6, e TNF- α , dependente da diminuição da sinalização de NF- κ B⁸², e induziu a expressão de antioxidantes ligados à ativação de Nrf2^{15,68,74}. Adicionalmente, o DMF apresentou impacto sobre a proteção neuronal, impedindo o aumento da neurotoxicidade causada pela excessiva ativação microglial⁹³.

Por todos os dados levantados até o momento sobre a disfunção cerebral na sepse, sabe-se que a sua fisiopatologia envolve a neuroinflamação e o estresse oxidativo. Tendo em vista os estudos supracitados, o DMF pode agir como fator de proteção contra estas alterações e, desta forma, sugere-se que ele possa contribuir para proteção cerebral na sepse.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de DMF sobre a disfunção cerebral após sepse experimental em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o infiltrado de neutrófilos no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex em 24 horas após indução de sepse em ratos sob a administração de DMF;
- Avaliar os níveis de TNF- α , IL-6 e CINC-1, no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex em 24 horas após indução de sepse em ratos sob administração DMF;
- Avaliar a concentração de nitrito e nitrato no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex em 24 horas após indução de sepse em ratos sob administração de DMF;
- Avaliar o dano oxidativo em lipídios e proteínas no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex em 24 horas após indução de sepse em ratos sob administração de DMF;
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes de SOD, CAT e GPx no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex em 24 horas após indução de sepse em ratos sob administração de DMF.

3. METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo pré-clínico utilizando modelo animal de sepse por CLP.

Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para os estudos dos aspectos fisiopatológicos e das consequências sistêmicas da sepse, assim como para a investigação de agentes potencialmente terapêuticos e seus mecanismos de ação⁹⁴. No entanto, o modelo de sepse abdominal por ligação e perfuração cecal (CLP) é conhecido com “padrão ouro”. O modelo tem sido amplamente utilizado ao longo dos últimos 30 anos, para estudar a fisiopatologia da sepse⁹⁴. O modelo de CLP foi desenvolvido entre outros pelo grupo de Chaudry na década de 1970⁹⁵.

A técnica baseia-se na ligação do ceco logo abaixo da válvula íleo cecal, perfuração do ceco com tamanho padronizado e liberação do conteúdo fecal para a cavidade peritoneal, conforme, classicamente, descrito por Wichterman e colaboradores⁹⁵. Desta maneira, além da peritonite, induz-se isquemia mesentérica, simulando as grandes síndromes clínicas de sepse abdominal⁹ (p.ex. apendicite, isquemia mesentérica). Representa vantagens como relativa simplicidade, reprodutibilidade e possibilidade de controlar o grau de contaminação bacteriana na cavidade peritoneal e, conseqüentemente, a mortalidade, pela mudança do tamanho da agulha e/ou número de perfurações realizadas no ceco⁹⁵.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os reagentes utilizados para as análises bioquímicas foram: ácido tiobarbitúrico, dinitrofenilhidrazina, epinefrina, catalase de fígado bovino, hidroperóxidos de tert-butila, albumina bovina, glutathione, glutathione reductase, NADPH, sulfanilamina, azida sódica, naftil etilenodiaminadicloridrato e reagente de Griess (Sigma, St. Louis, MO), ácido tricloroacético, ácido fosfórico, peróxido de hidrogênio, glicina, EDTA, (Labsynth, São Paulo, Brazil). Foram utilizados kits para citocinas da marca R&D Systems®. Quanto aos equipamentos, as análises de mieloperoxidase, nitrito/nitrato, dano em lipídios, proteínas, SOD e CAT, foram avaliadas em Espectrofotômetro (U2010, Hitachi) (Laboratório de Neurobiologia de

Processos Inflamatórios e Metabólicos - UNISUL) enquanto que as análises de GPx e citocinas foram realizadas em leitora de microplacas Spectramax M3 – Molecular Devices (Laboratório de Neurociências - UNESC).

3.3 ANIMAIS

Para este estudo, foram utilizados 57 ratos *Wistar* machos, adultos (60 dias), pesando entre 250-300 gramas (g), procedentes do biotério da Universidade do Vale do Itajaí, que foram recebidos e mantidos no Biotério da Unisul. 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 (das 7 horas às 19 horas). Os procedimentos cirúrgicos sempre foram realizados no período da manhã, com início às 8 horas.

3.4 INDUÇÃO DE SEPSE

No presente estudo, os animais foram submetidos ao modelo CLP⁹. Brevemente, os ratos foram anestesiados, com cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg), e submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal. O ceco foi ligado abaixo da junção íleo-cecal com fio seda 3-0 e perfurado com uma agulha número 14, e gentilmente, comprimido até a extrusão de conteúdo fecal. Os planos cirúrgicos foram fechados e os ratos observados por 2 horas. Todos os grupos receberam “suporte básico” (salina em 50 mL/kg imediatamente e 12 horas após CLP e ceftriaxona (30 mg/kg) e clindamicina (25 mg/kg) a cada 6 horas). Para o grupo controle, os animais foram submetidos à laparotomia, sem ligação ou perfuração cecal (sham). Para minimizar a variabilidade entre os diferentes experimentos, o procedimento CLP foi realizado sempre pelo mesmo pesquisador⁹.

3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Os animais foram tratados imediatamente após a indução de CLP e, 12 horas após, com DMF na dose de 15 mg/kg dissolvido em 0.08% de dimetilsulfóxido (veículo) por administração oral (gavagem)⁹⁶. A escolha desta via se dá porque o

DMF precisa ser lisado pelas esterases do intestino e formar o metabólito ativo MMF fazendo seu efeito esperado⁹⁶. Como controle positivo utilizamos o antioxidante NAC, diluído em salina, na dose de 20 mg/kg, administrado por via subcutânea em 3, 6 e 12 horas após CLP⁷⁸.

Os grupos foram divididos em sham+veículo; sham+NAC; sham+DMF; CLP+veículo; CLP+NAC e CLP+DMF com 7 animais por grupo experimental no que se refere aos grupos sham e 12 animais nos grupos CLP, considerando uma mortalidade cerca de 40% nos grupos CLP⁹⁷.

Para as análises bioquímicas, em um tempo de 24 horas após CLP, os animais foram submetidos ao procedimento de morte indolor assistida por overdose de tiopental e foram decapitados. O córtex pré-frontal (região mais frontal do córtex, relacionada à memória e à emoção)⁹⁸, hipocampo (parte medial do córtex, relacionado à memória a longo-prazo e na memória a curto-prazo com duração maior que alguns minutos)⁹⁸ e córtex (região mais externa do cérebro, que interliga outros sistemas, com funções sensoriais e motoras, aprendizado e memória)⁹⁸ foram retirados para posteriores análises. Abaixo, segue o desenho esquemático sobre os tratamentos realizados.

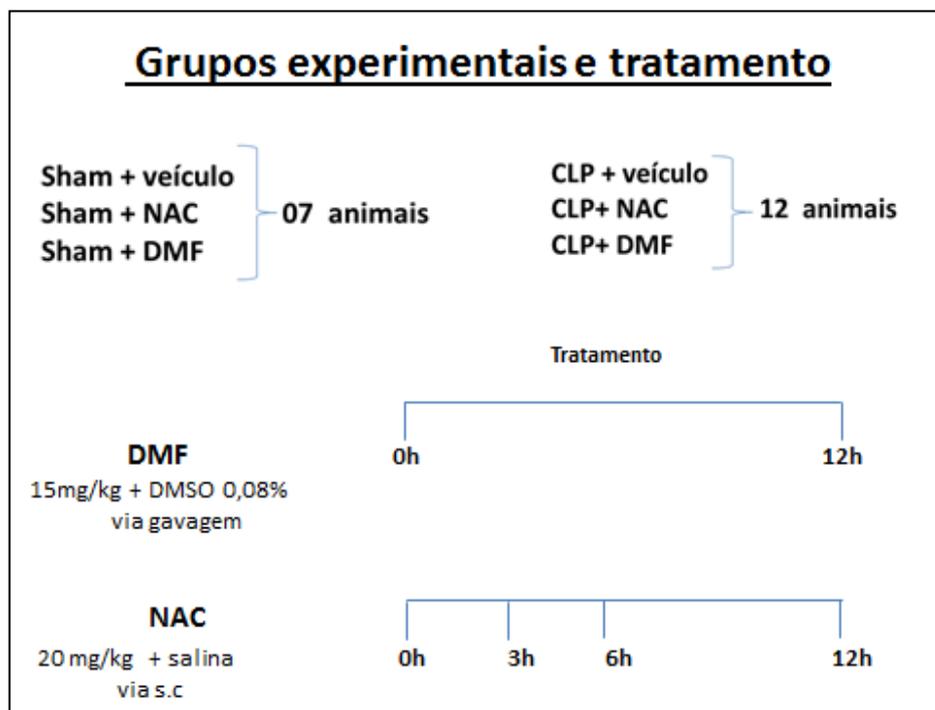


Figura 1 - Tratamentos realizados nos grupos experimentais (CLP) e controles (Sham).

Fonte: Elaborado pelas autoras, 2016.

3.6 TÉCNICAS

3.6.1 Atividade da mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase (MPO) é um indicativo do infiltrado de neutrófilos tecidual. Nesse sentido, o tecido será homogeneizado (50 mg/ml) em 0.5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugado. A suspensão foi sonicada e alíquota do sobrenadante misturada com solução de 1.6 mM TMB e 1 mM H₂O₂. A atividade da MPO foi mensurada espectrofotometricamente em 650nm a 37°C. Os resultados foram expressos como mU/mg proteína⁹⁹.

3.6.2 Níveis de citocinas

As concentrações de CINC-1, TNF- α , e IL-6 foram determinadas através da técnica de ELISA em leitor de microplacas. Inicialmente em uma placa com 96 poços, foram adicionados 100 μ l/poço do branco, padrão ou das amostras, procedendo-se à incubação da placa por 2 horas à temperatura ambiente em agitador tipo Kline com baixa rotação. Após esse período foi adicionado 100 μ l de reagente de detecção A, e incubado por 1 hora a 37°C. Lavou-se três vezes a placa com uma solução de lavagem.

Depois desse procedimento, adicionou-se 100 μ l do reagente B em cada poço, seguindo uma incubação de 30 minutos. Repetiu-se o procedimento de lavagem por cinco vezes. Então se adicionou 90 μ l de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina em cada poço, incubando a placa por 20 minutos a 37°C, esse procedimento gera uma coloração azul, ao final da incubação foi adicionado, rapidamente, a solução de parada de reação, e a leitura pontual foi realizada em leitora de microplaca, a 450 nm. A unidade de medida utilizada foi pg/ml.

3.6.3 Concentração total de nitrito/nitrato

A concentração de nitrito/nitrato (N/N) foi mensurada como indicativo da produção de óxido nítrico através da utilização da reação de Griess, por adição de 100 μ L de reagente de Griess [0.1% (w/v) naftil etilenodiaminadicloridrato em H₂O e 1% (p/v) sulfanilamida em 5% (v/v) H₃PO₄ concentrado], vol. [1:1] para 100 μ L de

amostra. A densidade óptica foi medida a 550 nm usando um espectrofotômetro e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína¹⁰⁰.

3.6.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Como índice dos efeitos do estresse oxidativo sobre os lipídeos, foi utilizada a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), durante uma reação ácida de aquecimento¹⁰¹. Resumidamente, as amostras foram misturadas com 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%, e, em seguida, aquecida em banho de água fervente a 100°C durante 30 minutos. TBARS foram determinadas pela absorvância a 535 nm, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído (nmol)/mg de proteína¹⁰¹.

3.6.5 Carbonilação protéica

O efeito do estresse oxidativo, em proteínas, foi avaliado por meio da determinação de grupos carbonil baseado na reação com dinitrofenilhidrazina. Resumidamente, as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina, e a absorvância foi aferida em 370 nm. Os resultados foram expressos como níveis de proteínas carboniladas (nmol)/mg de proteína¹⁰².

3.6.6 Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de McCord e Fridovich¹⁰³. A atividade da SOD foi medida com base em sua capacidade de inibir espontaneamente a oxidação da adrenalina em adrenocromo. A SOD presente na amostra compete pelo radical O_2^- , diminuindo a oxidação da adrenalina. Dessa forma, a velocidade de formação do adrenocromo em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM em pH 10,2) e adrenalina (60 mM), indica a atividade da SOD, a variação de absorvância é medida em 480nm. Uma unidade de SOD produz aproximadamente 50% de auto-oxidação de adrenalina. Os resultados foram expressos como U/mg de proteína¹⁰³.

A atividade da CAT foi determinada de acordo com o método de Aebi¹⁰⁴ e é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A reação utiliza o método que emprega H_2O_2 que deve ser convertido pela CAT em H_2O e O_2 . O tecido cerebral foi homogeneizado em tampão de fosfato 50 mmol/ L (pH 7,0), e a suspensão resultante foi centrifugada a 3000rpm durante 10 min. Uma alíquota de 100 μ l da amostra (20 μ l) foi adicionada a 1000 μ l da mistura de substrato¹⁰⁴. A mistura de substrato continha 0,3 ml de H_2O_2 em 50 ml de tampão ao fosfato 0,05 M (pH 7,0). Absorbâncias foram registradas em 240 nm nos tempos 0, 30 e 60 segundos após o início da reação. Uma curva padrão foi estabelecida utilizando catalase purificada (Sigma®, MO) em condições idênticas. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína¹⁰⁴.

A atividade da GPx foi determinada pelo método de Wendel¹⁰⁵, usando hidroperóxido de tert-butila como substrato. Em cubeta de quartzo, foram adicionados os seguintes reagentes: 600 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, 10 mL de azida sódica 40 mM, 15 mL de glutathione 100 mM, 15 mL glutathione redutase 10 U/ml, 10 mL NADPH 10 mM e 10 mL de amostra (0,1 - 0,3 μ g de proteína)¹⁰⁵. Esta mistura foi incubada a 25 0C durante 1 minuto, a fim de estabilizar o meio, e após foram adicionados 50 mL de hidroperóxido de tert-butila 10 mM para iniciar a reação. Os brancos foram preparados substituindo a amostra por tampão fosfato¹⁰⁵. A queda da absorvância a 340 nm foi acompanhada durante 240 segundos e a atividade da GPx foi calculada, utilizando-se o coeficiente de extinção do NADPH a 340 nm de 6,2 mM⁻¹ cm⁻¹. A atividade da GPx foi calculada como U/mg de proteína (1U = 1 mmol NADPH consumido/min)¹⁰⁵.

3.6.7 Determinação de proteínas totais

Todos os resultados das análises bioquímicas foram normalizados com a quantidade de proteínas avaliada de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores¹⁰⁶.

3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Abaixo estão descritas e classificadas as variáveis desse estudo, as unidades de medidas empregadas e a proposta de utilização das mesmas.

Quadro 1 - Variáveis do estudo.

Variável	Unidade de medida	Dependente (desfecho)	Independente (exposição)	Proposta de utilização
Indução de Sepses	-	X		
Níveis de TNF- α	pg/ml		X	Média e Desvio Padrão
Níveis de CINC-1	pg/ml		X	Média e Desvio Padrão
Níveis de IL-6	pg/ml		X	Média e Desvio Padrão
Concentração nitrito e nitrato	Um/mg proteína		X	Média e Desvio Padrão
Dano oxidativo em lipídios	equivalentes de MDA (nmol/mg de proteína)		X	Média e Desvio Padrão
Dano oxidativo em proteínas	nmol/mg proteína		X	Média e Desvio Padrão
Atividade da Superóxido Dismutase	U/mg proteína		X	Média e Desvio Padrão
Atividade da Catalase	U/mg proteína		X	Média e Desvio Padrão
Atividade da Glutathiona	U/mg proteína		X	Média e Desvio Padrão
Concentração de Mieloperoxidase	mU/mg proteína		X	Média e Desvio Padrão

Fonte: Elaborado pelas autoras, 2016.

3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Dados foram expressos em média \pm desvio padrão e foram analisadas por ANOVA e teste post hoc Tukey. Para todas as análises, $p < 0.05$ foi considerado, estatisticamente, significativo e as análises foram executadas, utilizando o programa SPSS® versão 20.0. Os gráficos apresentados foram construídos no Graphpad Prism® versão 5.

3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), sendo aprovado o protocolo experimental (protocolo número 15.009.4.03.IV), disponível no anexo A. A utilização dos animais seguiu os princípios da lei Arouca - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos - DBCA-2013¹⁰⁷. O descarte dos animais foi realizado 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).

4. RESULTADOS

4.1 O DMF REDUZ A NEUROINFLAMAÇÃO NA SEPSE

Os resultados referentes à figura 2 demonstram a atividade da MPO como um indicativo do infiltrado de neutrófilos ativados no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex, 24 horas após CLP. Os animais, submetidos à CLP e tratados apenas com veículo, apresentaram altos níveis de MPO, quando comparados ao grupo sham+veículo para todas as estruturas cerebrais estudadas. A administração de DMF foi efetiva em diminuir o infiltrado de neutrófilos em todas as estruturas cerebrais estudadas, exercendo uma melhor resposta que o uso do antioxidante clássico NAC, no córtex pré-frontal.

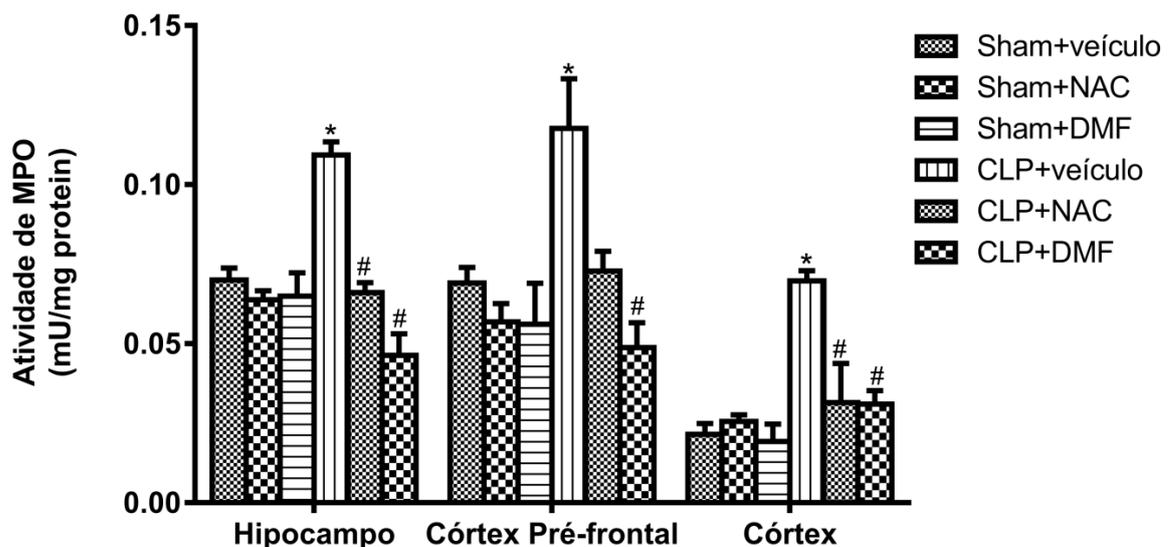


Figura 2 - Infiltrado de neutrófilos através da análise da atividade da MPO no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com DMF e NAC. Dados expressos como média \pm desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via com *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham+veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+veículo.

Fonte: Elaborado pelas autoras, 2016.

No que se refere aos níveis de citocinas (Figura 3A, B e C), inicialmente, houve elevação dos níveis da quimiocina CINC-1 (A) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex, todavia somente NAC diminuiu os níveis no hipocampo e, no córtex, houve a diminuição de CINC-1 com tratamento com NAC e DMF. Com relação aos

níveis de TNF- α (B), houve uma elevação no hipocampo e córtex pré-frontal 24 horas após a indução de sepse. DMF foi eficaz na prevenção da elevação da citocina somente no hipocampo. Para os níveis de IL-6 (C), houve aumento significativo em todas as estruturas cerebrais estudadas, comparando-se o grupo CLP+veículo com sham+veículo. Novamente, o tratamento com DMF foi efetivo em diminuir o nível da citocina no hipocampo acompanhado do tratamento com NAC.

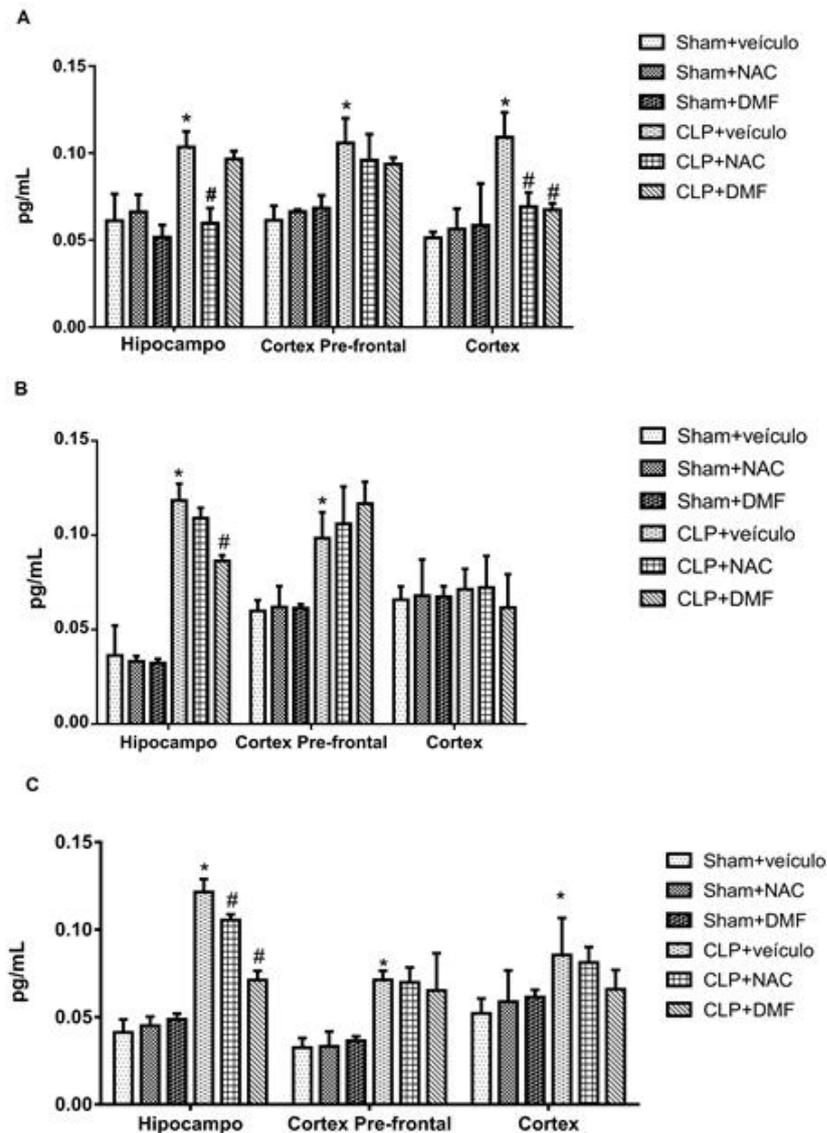


Figura 3 - Níveis de citocinas pró-inflamatórias CINC-1 (A), TNF- α (B) e IL-6 (C) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com DMF e NAC. Dados expressos como média \pm desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via com *post hoc* de Tukey.* $p < 0,05$ em relação ao grupo sham+veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+veículo.

Fonte: Elaborado pelas autoras, 2016.

4.2 O DMF REDUZ OS NÍVEIS CEREBRAIS DE ESTRESSE OXIDATIVO NA SEPSE

Na figura 4, verificou-se em 24 horas após CLP, que houve um aumento na concentração de N/N no hipocampo e córtex, quando submetidos a sepse, comparado ao grupo sham+veículo. Somente DMF diminuiu os níveis de N/N no hipocampo, enquanto que no córtex houve diminuição com NAC e DMF.

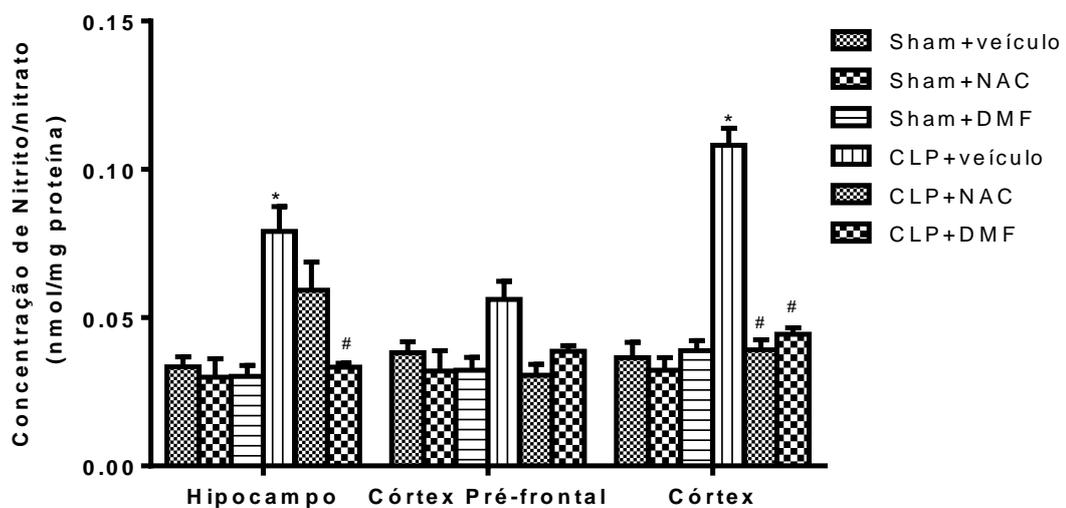


Figura 4 - Nível de N/N no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com DMF e NAC. Dados expressos como média \pm desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via com *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham+veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+veículo.

Fonte: Elaborado pelas autoras, 2016.

Para os níveis de dano oxidativo em lipídios (Figura 5A), houve aumento de dano em lipídios em todas as estruturas cerebrais quando submetidos à sepse. O tratamento com DMF foi efetivo em diminuir o dano no hipocampo e no córtex acompanhado ao tratamento com NAC. No que se refere aos níveis de proteínas carboniladas, como demonstrado na figura 5B, foi observado que, em 24 horas após CLP, que houve aumento do dano em proteínas, novamente, em todas as estruturas cerebrais estudadas. No hipocampo, houve uma diminuição desses níveis com NAC e DMF e no córtex pré-frontal e córtex, somente com DMF.

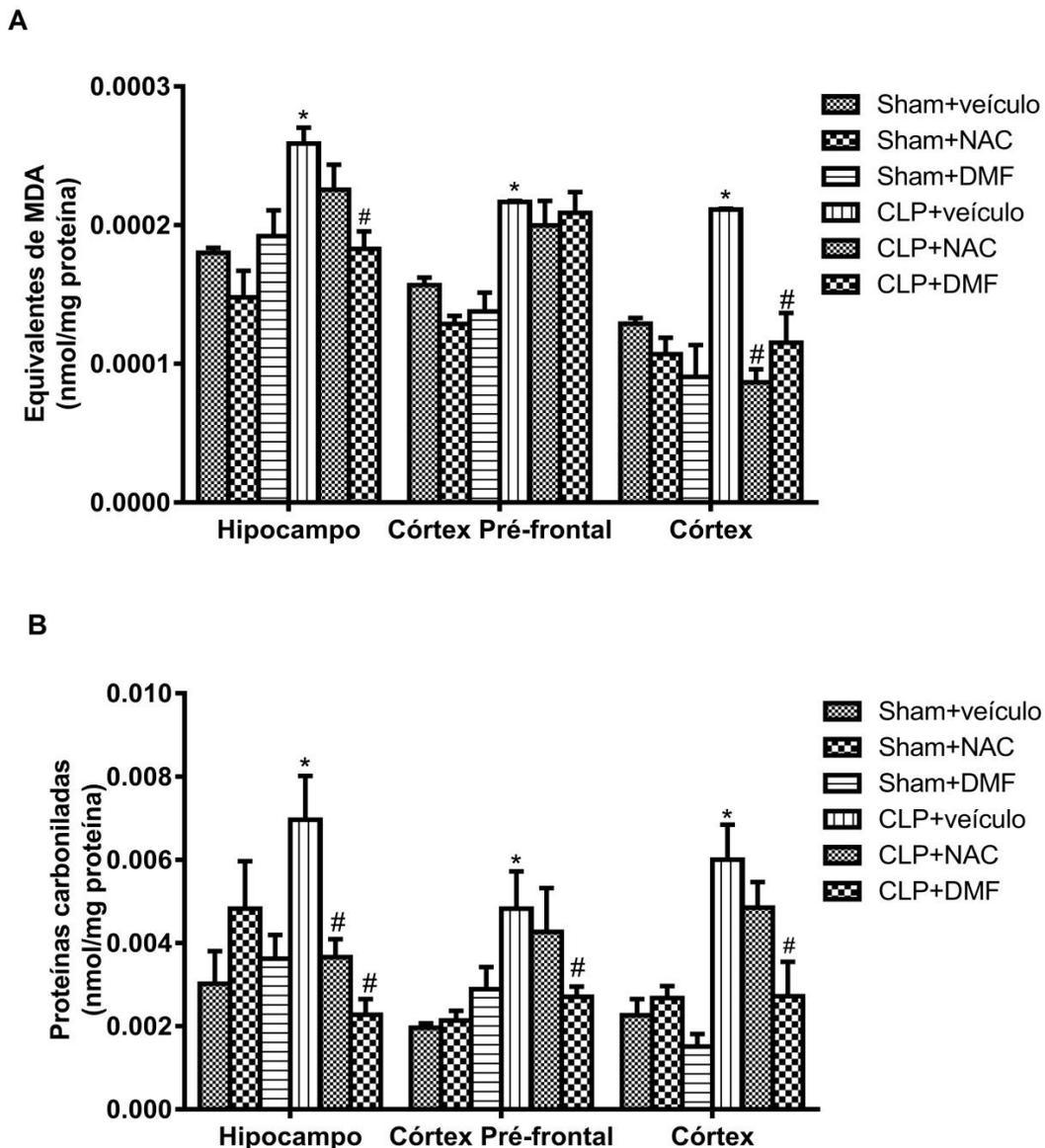


Figura 5 - Níveis de dano oxidativo em lipídios (A) e proteínas (B) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com DMF e NAC. Dados expressos como média \pm desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via com *post hoc* de Tukey.* $p < 0,05$ em relação ao grupo sham+veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+veículo.

Fonte: Elaborado pelas autoras, 2016.

A atividade da enzima antioxidante SOD foi diminuída nas três estruturas cerebrais, quando os animais foram submetidos à CLP+veículo comparados ao controle sham+veículo (Figura 6A). O tratamento com DMF mostrou-se efetivo no aumento da atividade da enzima somente no hipocampo. Quando analisada a atividade da CAT (Figura 6B), não foram verificadas alterações com a indução da sepse nas estruturas cerebrais e os tratamentos não apresentaram diferença

significativa. Por outro lado, observou-se uma diminuição na atividade da GPx (Figura 6C) nas estruturas cerebrais estudadas, quando submetidos à sepse e ao tratamento com NAC e DMF reverteram esses níveis no hipocampo, enquanto que no córtex, apenas o tratamento com DMF foi efetivo em aumentar os níveis de GPx.

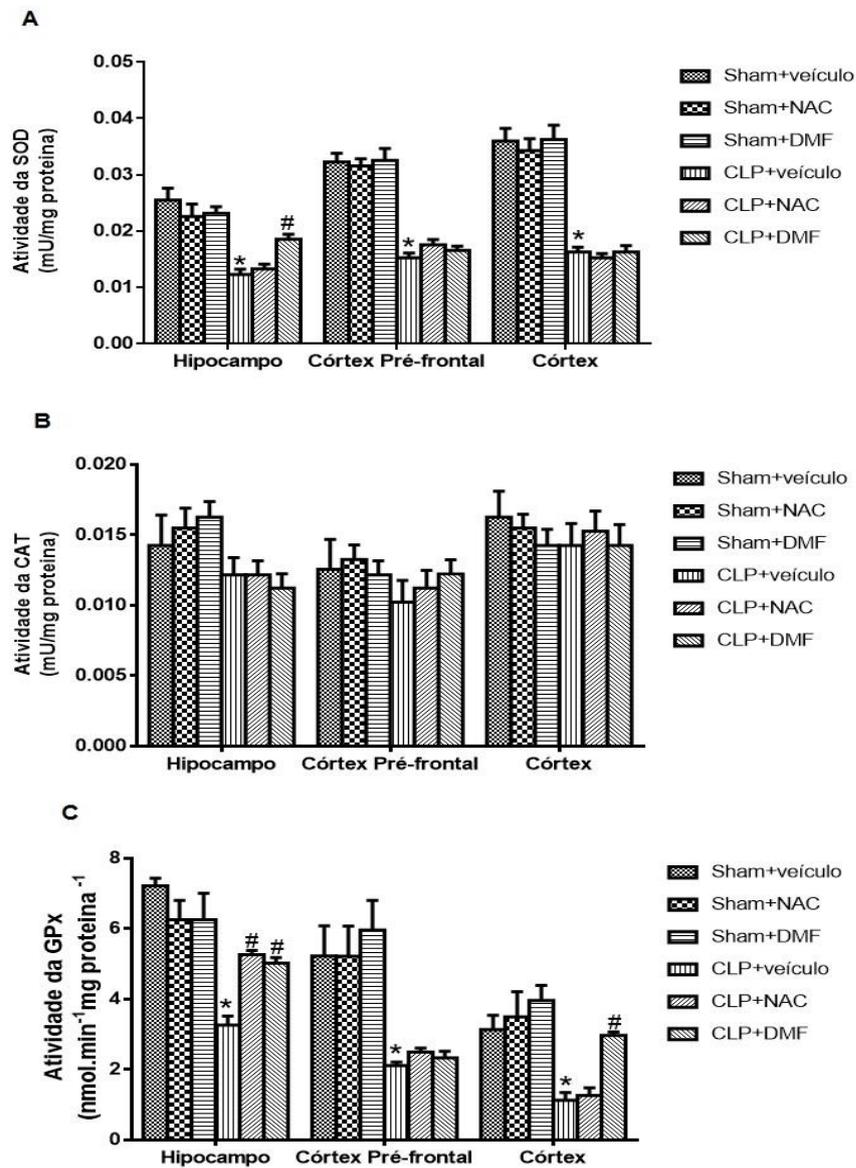


Figura 6 - Níveis da atividade da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com DMF e NAC. Dados expressos como média \pm desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via com *post hoc* de Tukey.* $p < 0,05$ em relação ao grupo sham+veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+veículo.

Fonte: Elaborado pelas autoras, 2016.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da disfunção cerebral na sepse é uma condição que contribui para a sua elevada mortalidade. Na fisiopatologia da EAS, estão envolvidos o desenvolvimento da inflamação exacerbada, assim como o estresse oxidativo que podem provocar alterações em neurotransmissores e, conseqüentemente, alterações comportamentais afetando negativamente a qualidade de vida de sobreviventes à sepse⁷³. No presente estudo, foram avaliados os efeitos de DMF sobre a disfunção cerebral após sepse experimental em ratos. Nos animais tratados com DMF, houve diminuição do infiltrado de neutrófilos no hipocampo e córtex pré-frontal, diminuição nos níveis de citocinas TNF- α e IL-6 no hipocampo e diminuição de CINC-1 no córtex. No que se refere às análises de estresse oxidativo, o DMF diminuiu os níveis de N/N no hipocampo e córtex, diminuiu o dano em lipídios no hipocampo e córtex e dano em proteínas carboniladas no córtex pré-frontal e córtex. Quanto à atividade das enzimas antioxidantes, para SOD, DMF foi efetivo no aumento da atividade desta somente no hipocampo, a enzima GPx aumentou seus níveis no hipocampo e córtex, enquanto que a atividade da enzima CAT não apresentou diferença significativa.

A resposta inflamatória sistêmica associada à fisiopatologia da sepse induz à ativação de células endoteliais da BHE, que resultam no estímulo para liberação de mediadores pró-inflamatórios no parênquima cerebral⁷³. Sabe-se, ainda, que proteínas como as metaloproteinases de matriz (MMP)-2 e MMP-9 estão, intimamente, relacionadas à degradação das junções apertadas que garantem a integridade da BHE e suas funções¹⁰⁸. E que, as citocinas são capazes de induzir a ativação destas MMPs, propiciando a permeabilidade da BHE. Em modelo animal de sepse polimicrobiana, foi verificado, previamente, que a permeabilidade da BHE ocorre em 24 horas após o início da doença¹⁰⁹, sendo acompanhada pelo aumento da migração de neutrófilos para estruturas cerebrais como o hipocampo³. Diante do exposto, o primeiro achado do nosso estudo acompanhou os resultados prévios em que observamos o aumento da atividade da MPO como um indicativo do infiltrado de neutrófilos em todas as estruturas cerebrais estudadas, atenuado através do tratamento com DMF, exercendo efeito inclusive melhor que o antioxidante padrão NAC no córtex pré-frontal.

Dentro desse quadro, o DMF, juntamente com seu metabólito ativo MMF, vem utilizando seu potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias e relacionadas ao estresse oxidativo¹¹⁰.

Após a administração oral, o DMF é metabolizado para MMF, atingindo níveis detectáveis no SNC, apresentando efeito direto sobre as células residentes do mesmo⁸². Em pacientes com esclerose múltipla recorrente-remitente, o DMF é considerado um potente tratamento imunomodulador por via oral. Foi verificado que tem a capacidade de atravessar a BHE, exercendo assim, efeitos de neuroproteção, através da modulação da ativação da micróglia⁸². A micróglia ativada é um elemento crítico da cascata neuroinflamatória, pois libera citocinas pró-inflamatórias e EROs e ERNs, conduzindo a neurodegeneração e alteração da transmissão sináptica, como ocorre em doenças neurodegenerativas, tais como a esclerose múltipla⁸². O tratamento com DMF pode reduzir a inflamação do cérebro, devido à menor ativação microglial e, conseqüentemente, a níveis menores de citocinas pró-inflamatórias no SNC e com menor atração de células imunes como neutrófilos para esta região¹¹¹.

Um estudo sobre esclerose múltipla utilizando o modelo experimental de encefalomielite, demonstrou que os neutrófilos se infiltram no SNC e que o tratamento com DMF reverte essa infiltração¹¹². O trabalho demonstrou que DMF é capaz de inibir a adesão de neutrófilos às células endoteliais do cérebro através da ativação do ácido hidrocarboxílico, um receptor de membrana acoplado à proteína G. O ácido hidrocarboxílico ativa a proteína quinase ERK, que é capaz de diminuir a migração de neutrófilos às células endoteliais do cérebro¹¹².

Em modelo animal de acidente vascular cerebral isquêmico, também se verificou o papel protetor de DMF no cérebro¹¹¹. Os ratos tratados com DMF reduziram o infiltrado de neutrófilos, o número de micróglia ativadas na região do enfarte cerebral e os níveis de citocinas pró-inflamatórias¹¹¹.

Quimiocinas como CINC-1, o homólogo de rato para Interleucina-8 (IL-8) de humanos, possui papel fundamental na quimiotaxia de neutrófilos¹¹³. Em nosso estudo, o aumento dos níveis de CINC-1, assim como TNF- α e IL-6 seguiu o perfil do aumento de MPO nas estruturas cerebrais estudadas. O aumento da presença de neutrófilos ativados no encéfalo permite que sejam liberadas outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6¹¹³. Quando as células gliais reconhecem estas moléculas, há ativação de diferentes vias intracelulares, incluindo a via que leva à

ativação de NF- κ B na micróglia com conseqüente progressão da elevação de citocinas pró-inflamatórias⁸².

A fisiopatologia de doenças inflamatórias e autoimunes, como a esclerose múltipla, está associada com a ativação de NF- κ B presentes no citoplasma de células do sistema imunológico¹¹⁴. Quando ativado por estímulos causados por toxinas bacterianas e mediadores inflamatórios, o NF- κ B tem potencialidade de ativar genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como CINC-1, TNF- α e IL-6¹¹⁴. Em micróglia ativada com LPS, foi demonstrado que o tratamento com DMF diminuiu a liberação de citocinas pró-inflamatórias, pela diminuição da ativação de NF- κ B⁵⁸.

Estudos mostram que o papel anti-inflamatório exercido por DMF se refere a sua influência sobre a inibição da ativação de NF- κ B^{79,115-117}. A ação de inibição de NF- κ B, exercida por DMF, ocorre pela ativação de outro fator de transcrição, o Nrf2⁸⁹. Foi verificado que a indução de uma via de ARE dependente de Nrf2 inibe a transcrição nuclear de NF- κ B, impedindo a produção de mediadores pró-inflamatórios. Estudos utilizando camundongos knockout Nrf2-/- mostraram aumento da ativação de NF- κ B, citocinas e quimiocinas, após insulto inflamatório, tal como induzido por LPS ou TNF- α ⁸⁹, e após injúria induzida por modelo animal de traumatismo crânio encefálico¹¹⁸.

Dados de estudos clínicos e experimentais indicam que a sepse está associada com um aumento na produção de EROs, diminuição da capacidade antioxidante e acúmulo de marcadores de dano oxidativo^{11,119,120}. Dessa forma, a resposta inflamatória na sepse é caracterizada pela liberação excessiva de citocinas, associada ao aumento de estresse oxidativo, levando à disfunção mitocondrial, com conseqüente morte celular¹²¹.

O cérebro é frequentemente exposto às EROs, devido ao seu alto consumo de oxigênio e, durante a sepse, parece ser um dos primeiros órgãos afetados¹²¹. Os neurônios são as células mais dependentes de oxigênio dentre os tipos celulares do SNC⁶⁹ e a degeneração mitocondrial e apoptose têm sido observadas em diferentes regiões cerebrais de pacientes sépticos e em modelos animais^{122,123}.

Chuang e colaboradores demonstraram, experimentalmente, em ratos sépticos, um aumento na produção de ânion superóxido (O₂⁻) no tecido cerebral¹²⁴. Adicionalmente, níveis aumentados de óxido nítrico (NO) e de peroxinitrito (ONOO⁻) no cérebro desempenham um papel crítico na função neuronal na sepse⁶⁹.

DMF, em nosso estudo, regulou os níveis de N/N como indicativo da produção de ONOO- no hipocampo e córtex pré-frontal sendo, inclusive, melhor que o tratamento com NAC no hipocampo. Wilms e colaboradores mostraram, previamente, que DMF diminui a síntese de NO em cultura de micróglia e astrócitos estimulados com LPS e tal resposta é dependente da ativação de Nrf2⁸³. Em nosso estudo, a diminuição de ONOO- causada por tratamento com DMF, interessantemente, refletiu-se na diminuição de dano oxidativo em lipídios e proteínas.

A literatura demonstra que o uso de antioxidantes representa um alvo terapêutico que pode reduzir o risco de algumas condições de dano neurológico relacionados ao aumento da oxidação de estruturas celulares como lipídios e proteínas¹²⁵. Os mecanismos endógenos de ações antioxidantes incluem a remoção de espécies reativas de oxigênio protegendo as células dos danos oxidativos¹²⁵.

Sabe-se que, entre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na disfunção cerebral na sepse, encontra-se a alteração de produção de enzimas antioxidantes como a SOD, CAT e GPx². Observou-se, no presente estudo, que tais resultados se reforçam no que se refere à atividade da SOD e GPx em que para todas as estruturas cerebrais houve uma diminuição da atividade dessas enzimas.

Estudos mostram que o estresse oxidativo induz a translocação de Nrf2 para o núcleo da célula onde ativam genes que codificam ARE^{19,126,127}. Postula-se dessa forma que DMF por ter efetividade em ativar a via que regula a ativação de Nrf2, tenha resultado no aumento da produção de SOD no hipocampo no presente estudo. Adicionalmente para a atividade da GPx, pode proporcionar o aumento da atividade da enzima no hipocampo, assim como a NAC e exerceu atividade melhor do que NAC no córtex.

NAC refere-se a um antioxidante clássico por ser um precursor de aminoácido cisteína que é necessário para a síntese de glutathione¹²⁸. Na sepse, diversos estudos relacionam a efetividade de NAC na diminuição do dano oxidativo, tanto em órgãos periféricos como no SNC^{63,77,129}. Observou-se, que DMF foi efetivo contra as alterações oxidativas e, inclusive, melhor que NAC na atividade da GPx.

Portanto, mostramos no presente estudo, que o DMF exerce efeito contra a neuroinflamação e como antioxidante em estruturas cerebrais importantes relacionadas à disfunção cerebral na sepse, possivelmente, por exercer seu papel sobre as vias que regulam NF-κB e Nrf-2.

6. CONCLUSÃO

A sepse polimicrobiana induziu o aumento do influxo de neutrófilos, de quimiocina e citocinas no SNC, além do aumento de nitrito/nitrato, dano em lipídios e proteínas e diminuição de enzimas antioxidantes como a SOD e GPx. O tratamento com DMF foi eficaz em reverter tais parâmetros, sendo inclusive mais efetivo que a administração do antioxidante clássico NAC em diferentes avaliações realizadas.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Estudos adicionais são necessários para definir melhor a interação complexa entre as vias que regulam NF- κ B e Nrf2, que acredita-se serem as vias responsáveis pelos efeitos de DMF descritos no presente estudo. Além disso, torna-se importante estudar o efeito de DMF nas alterações comportamentais relacionadas à fisiopatologia da disfunção cerebral na sepse como o dano à memória e ao aprendizado.

REFERÊNCIAS

1. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):4-11.
2. Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, et al. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 2006;34:886-9.
3. Comim CM, Vilela MC, Constantino LS, Petronilho F, Vuolo F, Lacerda-Queiroz M, et al. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. *Intensive Care Med*. 2011;37:711-8.
4. 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.
5. Hawkins BT, Davis TP. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol Rev*. 2005;57:173-85.
6. Von Bernhardi R. The Blood-Brain Barrier and the Pathology of the Central Nervous System: Its importance for the Inflammatory Response. *Rev Chil Neuro-Psiquiat*. 2004;42(2):121-30.
7. Yi L, Chandrasekaran P, Venkatesan S. TLR signaling paralyzes monocyte chemotaxis through synergized effects of p38 MAPK and global Rap-1 activation. *PLoS One* 2012;7(2):e30404.
8. Kacimi R, Giffard RG, Yenari MA. Endotoxin-activated microglia injure brain derived endothelial cells via NF- κ B, JAK-STAT and JNK stress kinase pathways. *J Inflamm (Lond)*. 2011;7;8-7.
9. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res*. 1990;49:186-96.
10. Steckert AV, Comim CM, Mina F, Mendonça BP, Dominguni D, Ferreira GK, et al. Late brain alterations in sepsis-survivor rats. *Syn*. 2013;67(11):786-93.
11. Petronilho F, Périco SR, Vuolo F, Mina F, Constantino L, Comim CM, et al. Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2012 Aug;26(6):904-10.
12. Schwalm MT, Pasquali M, Miguel SP, Dos Santos JP, Vuolo F, Comim CM, et al. Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive

- deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. *Mol. Neurobiol.* 2014;49(1):380-5.
13. Biff D, Petronilho F, Constantino L, Vuolo F, Zamora-Berridi GJ, Dall'Igna DM, et al. Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. *Shock.* 2013 Jul;40(1):45-8.
 14. Zampieri FG, Park Marcelo, Machado FS, Azevedo LCP. Sepsis-associated encephalopathy: not just delirium. *CLINICS* 2011;66(10):1825-31.
 15. Albrecht P, Bouchachia I, Goebels N, Henke N, Hofstetter HH, Issberner A, et al. Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. *J Neuroinflammation.* 2012;9:163.
 16. Parodi B, Cordano C, Morando S, Bragoni A, Giunti D, Usai C, et al. Monomethyl fumarate inhibits the NF- κ B pathway and pro-inflammatory cytokine expression in microglia through HCA2 signaling via the AMPK/Sirt axis. *J Neuroimmunol.* 2014 Oct 15;275:167-8.
 17. Werdenberg D, Joshi R, Wolfram S, Merkle HP, Langguth P. Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters. *Biopharm Drug Dispos.* 2003 Sep;24(6):259-73.
 18. Litjens NH, Burggraaf J, van Strijen E, van Gulpen C, Mattie H, Schoemaker RC, et al. Pharmacokinetics of oral fumarates in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2004 Oct;58(4):429-32.
 19. Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul.* 2006;46:113-40.
 20. Linker RA, Lee DH, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain.* 2011;134:678-92.
 21. Wierinckx A, Brevé J, Mercier D, Schultzberg M, Drukarch B, Van Dam AM. Detoxication enzyme inducers modify cytokine production in rat mixed glial cells. *J Neuroimmunol.* 2005;166(1-2):132-43.
 22. Scannevin RH, Chollate S, Jung MY, Shackett M, Patel H, Bista P, et al. Fumarates promote cyto-protection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;341(1):274-84.
 23. Jay K. Kolls. Oxidative stress in sepsis: a redox redux. *J Clin Invest.* Apr 3, 2006;116(4):860-3.

24. Thimmulappa RK1, Lee H, Rangasamy T, Reddy SP, Yamamoto M, Kensler TW, et al. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest*. 2006 Apr;116(4):984-95.
25. Liu L, Xie K, Chen H, Dong X, Li Y, Yu Y, et al. Inhalation of hydrogen gas attenuates brain injury in mice with cecal ligation and puncture via inhibiting neuroinflammation, oxidative stress and neuronal apoptosis. *Brain Res*. 2014 Nov 17;1589:78-92.
26. Semmler A, Hermann S, Mormann F, Weberpals M, Paxian SA, Okulla T, et al. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *J Neuroinflammation*. 2008 Sep;15:5-38.
27. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992 Jun;101(6):1644-55.
28. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801-10.
29. Warren HS. Strategies for the treatment of sepsis. *New Engl J*. 1997;336:952-3.
30. Markwart R, Condotta SA, Requardt RP, Borken F, Schubert K, Weigel C, et al. Immunosuppression after Sepsis: Systemic Inflammation and Sepsis Induce a Loss of Naïve T-Cells but No Enduring Cell-Autonomous Defects in T-Cell Function. Efron PA, ed. *PLoS One*. 2014;9(12):e115094.
31. Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, et al. Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding. *Physiol Rev*. 2013;93(3):1247-88.
32. Hosokawa K, Gaspard N, Su F, Oddo M, Vincent J-L, Taccone FS. Clinical neurophysiological assessment of sepsis-associated brain dysfunction: a systematic review. *Crit Care*. 2014;18(6):674.
33. Hayakawa M, Saito S, Uchino S, Yamakawa K, Kudo D, Iizuka Y, Sanui M, et al. Characteristics, treatments, and outcomes of severe sepsis of 3195 ICU-treated adult patients throughout Japan during 2011-2013. *J Intensive Care*. 2016 Jul 12;4:44.
34. Azkárate I, Choperena G, Salas E, Sebastián R, Lara G, Elósegui I, et al. Epidemiology and prognostic factors in severe sepsis/septic shock. Evolution over six years. *Med Intensiva*. 2016 Jan-Feb;40(1):18-25.

35. Fedeli U, Piccinni P, Schievano E, Saugo M, Pellizzer G. Growing burden of sepsis-related mortality in northeastern Italy: a multiple causes of death analysis. *BMC Infect Dis.* 2016 Jul 13;16:330.
36. Silva E, Pedro M de A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care* 2004;8:R251R260.
37. Sales Junior JA, David CM, Hatum R, Souza PC, Japiassú A, Pinheiro C, et al. Sepse Brasil: estudo epidemiológico da sepse em unidades de terapia intensiva brasileiras. *Rev Bras Ter Intensiva*, 2006;18:917.
38. Semmler A, Widmann CN, Okulla T, Urbach H, Kaiser M, Widman G, et al. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013 Jan;84(1):62-9.
39. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA.* 2010 Oct 27;304(16):1787-94.
40. Iwashyna TJ, Cooke CR, Wunsch H, Kahn JM. Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in older Americans. *J Am Geriatr Soc.* 2012 Jun;60(6):1070-7.
41. Iacobone E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens RD, Sharshar T. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Crit Care Med.* 2009 Oct;37(10 Suppl):S331-6.
42. Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D. Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Med.* 2007 Jun;33(6):941-50.
43. Dal-Pizzol F, Tomasi CD, Ritter C. Septic encephalopathy: does inflammation drive the brain crazy? *Rev Bras Psiquiatr.* 2014 Sep;36(3):251-8.
44. Hughes CG, Patel MB, Pandharipande PP. Pathophysiology of acute brain dysfunction: what's the cause of all this confusion? *Curr Opin Crit Care* 2012;18:518-26.
45. Cruvinel WM, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev. vers. Reumatol.* 2010;50(4):434-47.
46. Angus DC, Van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med* 2013;369:840-51.

47. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 1999;274:10689-92.
48. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, et al. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem.* 1999;274:33419-25.
49. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 1999;401:811-5.
50. Jones BW, Means TK, Heldwein KA, et al. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol.* 2001;69:1036-44.
51. Armstrong L, Medford ARL, Hunter KJ, Uppington KM, Millarl AB. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clinical and Experimental Immunology.* 2004;136(2):312-9.
52. Roger T, Froidevaux C, Le Roy D, et al. Protection from lethal Gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106(7):2348-52.
53. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJC, Kuiper J. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. *Clinical Microbiology Reviews.* 2003;16(3):379-414.
54. Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the Discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol.* 2006;72:1102-13.
55. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence.* 2014;5(1):36-44.
56. Michels M, Danieski LG, Vieira A, Florentino D, Dall'Igna D, Galant L, et al. CD40-CD40 Ligand Pathway is a Major Component of Acute Neuroinflammation and Contributes to Long-term Cognitive Dysfunction after Sepsis. *Mol Med.* 2015 Mar 26;21:219-26.
57. Mina F, Comim CM, Dominguni D, Cassol-Jr OJ, Dall'Igna DM, Ferreira GK, et al. Il1-b involvement in cognitive impairment after sepsis. *Mol. Neurobiol.* 2014;49:1069-76.
58. Michels M, Vieira AS, Vuolo F, Zapelini HG, Mendonça B, Mina F, Dominguni D, et al. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain Behav Immun.* 2015 Jan;43:54-9.

59. Michels M, Danielski LG, Dal-Pizzol F, Petronilho F. Neuroinflammation: microglial activation during sepsis. *Curr Neurovasc Res.* 2014;11(3):262-70.
60. Chelkeba L, Ahmadi A, Abdollahi M, Najafi A, Ghadimi MH, Mosaed R, et al. The effect of parenteral selenium on outcomes of mechanically ventilated patients following sepsis: a prospective randomized clinical trial. *Ann. Intensive Care.* 2015;5:29.
61. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv in Aging.* 2007 Jun;2(2):219-36.
62. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010 Jul-Dec;4(8):118-26.
63. Andrades M, Ritter C, de Oliveira MR, Streck EL, Fonseca Moreira JC, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment reverses organ failure in rat model of sepsis: role of antioxidant enzymes imbalance, neutrophil infiltration, and oxidative stress. *J Surg Res.* 2011 May 15;167(2):e307-13.
64. Zheng G, Lyu J, Huang J, Xiang D, Xie M, Zeng Q. Experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis: A narrative review. *J Res Med Sci.* 2015 Feb;20(2):185-95.
65. Lange M, Szabo C, Traber DL, Horvath E, Hamahata A, Nakano Y, et al. Time profile of oxidative stress and neutrophil activation in ovine acute lung injury and sepsis. *Shock.* 2012 May;37(5):468-72.
66. Cantor M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence.* 2014 Jan 1;5(1):66-72.
67. Pham-Huy LA, Ele H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008 Jun;4(2):89-96.
68. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are now. *J Neurochem.* 2006 Jun;97(6):1634-58.
69. Berg RM, Moller K, Bailey DM. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011 Jul;31(7):1532-44.
70. 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 Nov 29;362(9398):1799-805.
71. De Bock M, Wang N, Decrock E, Bol M, Gadicherla AK, Culot M, et al. Endothelial calcium dynamics, connexin channels and blood-brain barrier function. *Prog Neurobiol.* 2013 Sep;108:1-20.

72. Júnior LR, Höehr NF, Vellasco AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova*, 2001;24(1):112-9.
73. Sonnevile R, Verdonk F, Rauturier C, Klein I, Wolff M, Annane D, et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann Intensive Care*. 2013 May 29;3(1):15.
74. Spapen H. N-acetylcysteine in clinical sepsis: a difficult marriage. *Crit Care*. 2004 Aug;8(4):229-30.
75. Bernardi FC, Felisberto F, Vuolo F, Petronilho F, Souza DR, Luciano TF, et al. Oxidative damage, inflammation, and Toll-like receptor 4 pathway are increased in preeclamptic patients: a case-control study. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:636419.
76. Silvestre F, Danielski LG, Michels M, Florentino D, Vieira A, Souza L, et al. Effects of organoselenium compounds on early and late brain biochemical alterations in sepsis-survivor rats. *Neurotox Res*. 2014 Nov;26(4):382-91.
77. Cassol OJ Jr, Rezin GT, Petronilho FC, Scaini G, Gonçalves CL, Ferreira GK, et al. Effects of N-acetylcysteine/deferrioxamine, taurine and RC-3095 on respiratory chain complexes and creatine kinase activities in rat brain after sepsis. *Neurochem Res*. 2010 Apr;35(4):515-2.
78. Barichello T, Machado RA, Constantino L, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, et al. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit. Care. Med*. 2007;35:2186-90.
79. Gillard GO, Collette B, Anderson J, Chao J, Scannevin RH, Huss DJ, et al. DMF, but not other fumarates, inhibits NF- κ B activity in vitro in an Nrf2-independent manner. *J Neuroimmunol*. 2015 Jun 15;283:74-85.
80. Nicholas JA, Boster AL, Imitola J, O'Connell C, Racke MK. Design of oral agents for the management of multiple sclerosis: benefit and risk assessment for dimethyl fumarate. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:897-908.
81. Tecfidera [package insert] Cambridge, MA: Biogen Idec Inc; March 2013.
82. Parodi B, Rossi S, Morando S, Cordano C, Bragoni A, Motta C, et al. Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS. *Acta Neuropathol*. 2015 Aug;130(2):279-95.
83. Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, Lucius R. Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing

- the synthesis of nitric oxide, IL-1 β , TNF- α and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation*. 2010 May 19;7:30.
84. Cross SA, Cook DR, Chi AW, Vance PJ, Kolson LL, Wong BJ, et al. Dimethyl fumarate, an immune modulator and inducer of the antioxidant response, suppresses HIV replication and macrophage-mediated neurotoxicity: a novel candidate for HIV neuroprotection. *J Immunol*. 2011 Nov 15;187(10):5015-25.
 85. Gill AJ, Kovacsics CE, Cross SA, Vance PJ, Kolson LL, Jordan-Sciutto KL, et al. Heme oxygenase-1 deficiency accompanies neuropathogenesis of HIV-associated neurocognitive disorders. *J Clin Invest*. 2014 Oct;124(10):4459-72.
 86. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999 Nov 22;18(49):6853-66.
 87. Singh S, Vrishni S, Singh BK, Rahman I, Kakkar P. Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radic Res*. 2010 Nov;44(11):1267-88.
 88. Hayes JD, Chanas SA, Henderson CJ, McMahon M, Sun C, Moffat GJ, et al. The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. *Biochem Soc Trans*. 2000 Feb;28(2):33-41.
 89. Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S, Kensler TW. When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid Redox Signal*. 2010 Dec 1;13(11):1649-63.
 90. Jin W, Wang H, Yan W, Xu L, Wang X, Zhao X, et al. Disruption of Nrf2 enhances upregulation of nuclear factor-kappaB activity, proinflammatory cytokines, and intercellular adhesion molecule-1 in the brain after traumatic brain injury. *Mediators Inflamm*. 2008;725174.
 91. Liu GH, Qu J, Shen X. NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim Biophys Acta*. 2008 May;1783(5):713-27.
 92. Hoogland IC, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation*. 2015 Jun 6;12:114.
 93. Zhao X, Sun G, Zhang J, Ting SM, Gonzales N, Aronowski J. Dimethyl Fumarate Protects Brain From Damage Produced by Intracerebral Hemorrhage by Mechanism Involving Nrf2. *Stroke*. 2015 Jul;46(7):1923-8.
 94. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW 3rd, Bland KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock* 24. 2005;(Suppl. 1):52-57.

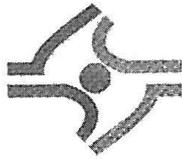
95. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock - a review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* 1980;29:189-201.
96. Reick C, Ellrichmann G, Thöne J, Scannevin RH, Saft C, Linker RA, et al. Neuroprotective dimethyl fumarate synergizes with immunomodulatory interferon beta to provide enhanced axon protection in autoimmune neuroinflammation. *Exp Neurol.* 2014 Jul;257:50-6.
97. Carvalho D, Petronilho F, Vuolo F, Machado RA, Constantino L, Guerrini R, et al. The nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Intensive Care Med.* 2008 Dec;34(12):2284-90.
98. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica.* 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
99. Young L De, Kheifets J, Ballaron S, Young J. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions.* 1989;(3-4):335-41.
100. Grenn LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry.* 1982 Oct;126(1):131-38.
101. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.
102. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464-78.
103. Bannister JV, Calabrese L. Assays for Superoxide Dismutase, in *Methods of Biochemical Analysis* 1987;2987;32(ed D. Glick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
104. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzym.* 1984;(105):121-6.
105. Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology.* 1981;77:325-332.
106. Lowry OH, NJ, Rosebrough AL, Farr and RJ Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
107. Brasil. Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA. 2013;1-50.

108. Vafadari B, Salamian A, Kaczmarek L. MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. *J Neurochem.* 2016 Oct;139 Suppl 2:91-114.
109. Dal-Pizzol F, Rojas HA, dos Santos EM, Vuolo F, Constantino L, Feier G, et al. Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis. *Mol Neurobiol.* 2013 Aug;48(1):62-70.110.
110. Gill AJ, Kolson DL. Dimethyl fumarate modulation of immune and antioxidant responses: application to HIV therapy. *Crit Rev Immunol.* 2013;33(4):307-59.
111. Lin R, Cai J, Kostuk EW, Rosenwasser R, Iacovitti L. Fumarate modulates the immune/inflammatory response and rescues nerve cells and neurological function after stroke in rats. *J Neuroinflammation.* 2016 Oct 13;13(1):269.
112. Chen H, Assmann JC, Krenz A, Rahman M, Grimm M, Karsten CM, et al. Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE. *J Clin Invest.* 2014 May;124(5):2188-92.
113. Reddy RC, Narala VR, Keshamouni VG, Milam JE, Newstead MW, Standiford TJ. Sepsis-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is mediated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Blood.* 2008 Nov 15;112(10):4250-8.
114. Leibowitz SM, Yan J. NF- κ B Pathways in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and the Therapeutic Implications. *Front Mol Neurosci.* 2016;9:84.
115. Gerdes S, Shakery K, Mrowietz U. Dimethylfumarate inhibits nuclear binding of nuclear factor kappaB but not of nuclear factor of activated T cells and CCAAT/enhancer binding protein beta in activated human T cells. *Br J Dermatol.* 2007 May;156(5):838-42.
116. Ghoreschi K, Bruck J, Kellerer C, Deng C, Peng H, Rothfuss O, et al. Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2011;208:2291-03.
117. Kastrati I, Siklos MI, Calderon-Gierszal EL, El-Shennawy L, Georgieva G, Thayer EN, et al. Dimethyl Fumarate Inhibits the Nuclear Factor κ B Pathway in Breast Cancer Cells by Covalent Modification of p65 Protein. *J Biol Chem.* 2016 Feb 12;291(7):3639-47.
118. Jin W, Zhu L, Guan Q, Chen G, Wang QF, Yin HX, et al. Influence of Nrf2 genotype on pulmonary NF- κ B activity and inflammatory response after traumatic brain injury. *Ann Clin Lab Sci.* 2008 Summer;38(3):221-7.

119. Vieira AA, Michels M, Florentino D, Nascimento DZ, Rezin GT, Leffa DD, et al. Obesity promotes oxidative stress and exacerbates sepsis-induced brain damage. *Curr Neurovasc Res.* 2015;12(2):147-54.
120. Annane D, Sharshar T. Cognitive decline after sepsis. *Lancet Respir Med.* 2015 Jan;3(1):61-9.
121. Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Rezin GT, et al. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res.* 2011 Feb;36(2):304-11.
122. 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 May;39 Suppl 1:10-6.
123. Kasahara E, Inoue M. Cross-talk between HPA-axis-increased glucocorticoids and mitochondrial stress determines immune responses and clinical manifestations of patients with sepsis. *Redox Rep.* 2015 Jan;20(1):1-10.
124. Chuang YC, Tsai JL, Chang AY, Chan JY, Liou CW, Chan SH. Dysfunction of the mitochondrial respiratory chain in the rostral 91 ventrolateral medulla during experimental endotoxemia in the rat. *J Biomed Sci.* 2012;9(6 Pt 1):542-8.
125. Sitar G, Kucuk M, Erinc Sitar M, et al. Crucial Roles of Systemic and Tissue Lipid Peroxidation Levels and Anti-Oxidant Defences Following Contrast Agent Application. *Iranian Red Crescent Med J.* 2016;18(6):e37331.
126. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells.* 2003 Apr;8(4):379-91.
127. Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med.* 2004 May 15;36(10):1208-13.
128. Minarini A, Ferrari S, Galletti M, Giambalvo N, Perrone D, Rioli G, et al. N-acetylcysteine in the treatment of psychiatric disorders: current status and future prospects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2016 Nov;2:1-14.
129. Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med.* 2004 Feb;32(2):342-9.

ANEXO

ANEXO A - Parecer Aprovação da Comissão de Ética em Uso de Animais



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 07 de maio de 2015.

Registro na CEUA (código): 15.009.4.03.IV

Ao pesquisador: Fabrícia Cardoso Petronilho
 Lucinéia Gainski Danielski

Curso de Farmácia - Campus Tubarão

Prezado(a) Pesquisador(a),

Vimos, através deste, informar que o projeto de pesquisa “**Avaliação dos efeitos antioxidantes, antiinflamatórios e neuroprotetores do dimetil fumarato na encefalopatia associada à sepse em modelo animal de sepse induzida por ligação e perfuração cecal**” foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da UNISUL.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, o disposto na legislação federal aplicável à criação e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informado imediatamente à Comissão de Ética no Uso de Animais da UNISUL.

Atenciosamente.

Peter Johann Bürger

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNISUL

Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina

☎ (48) 3279-1036

✉ ceua@unisul.br peter.burger@unisul.br



Antes de imprimir este e-mail pense em sua responsabilidade e compromisso com o MEIO AMBIENTE