



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
PAULA DIAS

**AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS TAU E
GSK-3 β EM TECIDO ENCEFÁLICO DE ANIMAIS ADULTOS APÓS ATIVAÇÃO IMUNE
NEONATAL**

Palhoça

2018

PAULA DIAS

**AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS TAU E
GSK-3 β EM TECIDO ENCEFÁLICO DE ANIMAIS ADULTOS APÓS ATIVAÇÃO IMUNE
NEONATAL
LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS**

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

Orientador (a): Prof.(Profa.) Clarissa Martinelli Comim Cassol, Dra.

Palhoça
2018

D53 Dias, Paula, 1989-

Avaliação da memória espacial e expressão das proteínas TAU e GSK-3 β em tecido encefálico de animais adultos após ativação imune neonatal / Paula Dias. – 2018.

54 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof^ª. Clarissa Martinelli Comim Cassol

1. Sistema nervoso central - Doenças - Tratamento. 2. Sistema imune.
3. Memória. I. Comim, Clarissa Martinelli. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária da Unisul



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Avaliação da memória espacial e expressão das proteínas TAU e GSK-3 β em tecido encefálico de animais adultos após ativação imune neonatal

PAULA DIAS

AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 15 de fevereiro de 2018.

Doutora Clarissa Martinelli Cornim (orientador) _____

Doutora Leandra Celso Constantino (avaliador externo) _____

Doutora Anna Paula Piovezan (avaliador interno) _____

Professor Doutor Jefferson Traebert

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus,

Aos meus amados e estimados pais e minha amada irmã, pelo apoio, paciência e compreensão pelos os momentos que estive ausente ao longo do mestrado.

Ao meu amado noivo, pelo apoio incondicional e constante incentivo.

A Profa. Clarissa Martinelli Comim Cassol, minha orientadora pela confiança, paciência, incentivo e excelente orientação.

A Profa. Anna Paula Piovezan, por toda ajuda e contribuição ao meu trabalho, sempre com tanta educação e compreensão que lhe é peculiar.

A Dra. Verônica Vargas Horewicz, por toda ajuda com os processos laboratoriais.

A minha colega de mestrado Simone Helena Schelder Marzzani, pelo companheirismo ao longo de tantas viagens neste tempo de mestrado.

Aos meus colegas do grupo Neuropat –Unisul Pedra Branca, pelo apoio e ajuda.

A todos os meus colegas e professores do Mestrado, que proporcionaram muitos momentos de aprendizagem.

Sem a colaboração de todos, nada disso seria possível,

Obrigada.

RESUMO

Introdução: O sistema imunológico dos neonatos ainda é imaturo, o que torna-os mais suscetíveis aos agentes infecciosos presentes nesse período. A ativação imune neonatal está associada a um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), provocando uma cascata inflamatória no Sistema Nervoso Central (SNC) e alterando parâmetros comportamentais e neuroquímicos. Uma das hipóteses que vem sendo estudada é que a neuroinflamação possa estar envolvida nos processos neurodegenerativos, como na Doença de Alzheimer (DA). **Objetivo:** Avaliar o comprometimento da memória visuo-espacial e a expressão das proteínas Tau e GSK-3 β em hipocampo e córtex de animais expostos a endotoxemia neonatal. **Métodos:** Camundongos C57BL/6 com dois dias de vida receberam uma única injeção de lipopolissacarídeo (LPS) subcutânea. Ao completarem 60, 120 e 180 dias de vida, a memória visuo-espacial foi avaliada através do Labirinto Aquático de Morris e as estruturas hipocampo e córtex dissecadas para avaliação da expressão das proteínas Tau e GSK-3 β através da técnica de *Western Blot*. **Resultados:** Os animais expostos ao LPS no período neonatal apresentaram um comprometimento da memória visuo-espacial com 120 e 180 dias de vida. Houve um aumento da expressão de GSK-3 β em hipocampo dos animais com 60, 120 e 180 dias de vida. Já no córtex, este aumento aconteceu somente em 120 e 180 dias. A expressão da proteína Tau estava elevada em hipocampo e córtex dos animais com 120 dias e apenas em córtex em 180 dias de vida. **Conclusão:** Os dados observados neste estudo mostram que a ativação imune neonatal pode estar associada a um comprometimento da memória visuo-espacial e a um aumento da expressão das proteínas GSK-3 β e Tau tardiamente. Estas evidências podem basear futuros estudos sobre a relação entre neuroinflamação neonatal e processos neurodegenerativos tardios.

Descritores: Ativação imune neonatal. Sistema Nervoso Central. Memória. GSK-3 β . Tau.

ABSTRACT

Introduction: The neonatal immune system is still immature, which makes them more susceptible to the infectious agents present in that period. Neonatal immune activation is associated with increased permeability of the blood-brain barrier (BBB), causing an inflammatory cascade in the Central Nervous System (CNS) and altering behavioral and neurochemical parameters. One of the hypotheses that has been studied is that neuroinflammation may be involved in neurodegenerative processes, such as in Alzheimer's disease (AD). **Objective:** To evaluate visuo-spatial memory and the expression of Tau and GSK-3 β proteins in hippocampus and cortex of animals exposed to neonatal endotoxemia. **Methods:** C57BL/6 mice with two days old received a single injection of subcutaneous lipopolysaccharide (LPS). At 60, 120 and 180 days old, visual-spatial memory was evaluated through the Morris water maze and the hippocampus and cortex were dissected to evaluate the expression of Tau and GSK-3 β proteins through the use of Western Blot. **Results:** In the animals exposed to LPS in the neonatal period there were a visuo-spatial memory impairment at 120 and 180 days old. There was an increase in the expression of GSK-3 β in hippocampus of the animals at 60, 120 and 180 days of life. In the cortex, this increase occurred only in 120 and 180 days old. Tau protein expression was high in hippocampus and cortex of animals at 120 days old and only in cortex at 180 days old. **Conclusion:** The data observed in this study show that neonatal immune activation may be associated with visuo-spatial memory impairment and increased expression of GSK-3 β and Tau proteins in long-term. These evidences may base future studies on the relationship between neonatal neuroinflammation and long-term neurodegenerative processes.

Keywords: neonatal immune activation, central nervous system, memory, GSK-3 β , Tau.

LISTAS

Lista de abreviaturas

APP- Proteína Percursora Amiloide

BHE- Barreira Hematoencefálica

COX-2- Ciclooxygenase 2

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

CFMV-Conselho Federal de Medicina Veterinária

CLP- Sepse por ligação e perfuração cecal (*cecal ligation puncture procedure*)

CONCEA-Conselho Nacional de Controle de Experimento Animal

DA- Doença de Alzheimer

GFAP- Proteína glial fibrilar ácida (*Glial fibrillary acidic protein*)

GSK3 – Glicogênio sintase- cinase 3

IL- Interleucina

IFN- Interferon

LANEX- Laboratório de Neurociência Experimental

LCR- Líquido Cefalorraquidiano

LPS- Lipopolissacarídeo

LTP- Potencial de longa duração (*Long Term Potentiation*)

MAP- Proteínas Associadas a Microtúbulos. (*Microtubule Associated Protein*)

MIA- Morte Indolor Assistida

MMP-9- Mioeloperoxidase de matriz 9

PBS – Tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*)

OMS- Organização Mundial da Saúde

PAMPs- Padrões Moleculares Associados à Patógenos (*Pathogen associated molecular pattern*).

PGE2- Prostaglandina E2

PRRs- Receptores de Reconhecimento de Padrões (*Pattern Recognition Receptor*)

ROS- do inglês *Reactive oxygen species*

SBNeC- Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento

SCON- *Staphylococcus coagulase*

SIRS- Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SNC- Sistema Nervoso Central

TLR- Toll-Like Receptor

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina

UNISUL- Universidade do Sul de Santa Catarina

UTIN- Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

Lista de quadros

Quadro 1 – Quadro de Variáveis.....29

Lista de figuras

Figura 1 – Delineamento do estudo27

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO | 11 |
| 1.1.1 Seps e ativação imune neonatal | 11 |
| 1.1.2 Neuroinflamação | 14 |
| 1.1.3 Processos de memória e aprendizado | 16 |
| 1.1.4 Neurodegeneração | 19 |
| 1.1.5 Modelo animal de ativação imune neonatal | 23 |
| 2. OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 24 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 24 |
| 3. MÉTODOS | 25 |
| 3.1 TIPO DE ESTUDO | 25 |
| 3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS | 25 |
| 3.3 ANIMAIS..... | 25 |
| 3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO | 26 |
| 3.5 ENSAIO/ TESTES/ TÉCNICAS | 27 |
| 3.5.1 Labirinto Aquático de Morris | 27 |
| 3.5.2 Imunoeletroforese - Western Blot | 28 |
| 3.5.2.1 Preparação das amostras | 28 |
| 3.5.2.2 Separação das proteínas e imunodeteção | 28 |
| 3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO..... | 29 |
| 3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS..... | 30 |
| 3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA | 30 |
| 4. RESULTADOS | 31 |
| 5. DISCUSSÃO | 36 |
| 6. CONCLUSÃO | 42 |
| 6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 42 |
| REFERÊNCIAS | 43 |
| ANEXO A - Parecer Aprovação do Comitê de Ética | 53 |

1. INTRODUÇÃO

Sepse neonatal caracteriza-se por sinais sistêmicos de infecção associada a presença de bacteremia nos primeiros 28 dias de vida^{1,2}. Configurando-se como uma dos principais fatores de mortalidade e morbidade entre os recém nascidos, a sepsé divide-se em precoce e tardia³, iniciando-se quando há a ação de agentes no organismo como endotoxinas gram-negativas ou exotoxinas segregadas, que podem desencadear a liberação local ou sistêmica de mediadores inflamatórios ⁴. Os principais mediadores inflamatórios presentes neste processo são as citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral tipo α (TNF- α) e as interleucinas (IL)-1 β , IL-6 e IL-8 ⁵. As citocinas pró-inflamatórias agem favorecendo a migração e ativação das células imunes. Deste modo, a inflamação persistente relacionada a sepsé ocasiona alterações em diversos órgãos e em especial o sistema nervoso central (SNC). O aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios pode aumentar a permeabilidade da BHE e desencadear a ativação da micróglia. A ativação microglial inicia um processo de neuroinflamação sustentada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias diretamente no tecido encefálico. O processo de neuroinflamação pode ocasionar alterações significativas em áreas específicas do SNC como córtex e hipocampo, provocando prejuízos nas funções cognitivas, como memória e aprendizado a longo prazo⁶.

Em um recente estudo, mostrou-se que animais expostos ao lipopolissacarídeo (LPS) no período neonatal apresentaram um comprometimento da memória aversiva, de habituação e de reconhecimento de objetos quando adultos⁷. No período neonatal, o SNC está em formação e qualquer alteração neste processo pode trazer prejuízos significativos tanto a curto como a longo prazo. Outro estudo demonstrou que a ativação imune sistêmica por LPS no terceiro e no quinto dia pós-natal aumentou os níveis de TNF- α e IL-1 β em hipocampo de animais avaliados quando adultos ⁸. Agudamente, foi verificado que uma única injeção de LPS no sétimo dia pós-natal aumentou os níveis de IL-6, IL-1 β e TNF- α associado a um aumento da ativação microglial em tecido encefálico após 48h e 7 dias da exposição endotoxêmica⁹.

Neste contexto, áreas encefálicas específicas, como córtex e hipocampo, estão envolvidas na formação e armazenamento dos processos de aprendizado e memória, em especial da memória visuo-espacial¹⁰. Esta memória consiste na capacidade de

codificar, armazenar e recuperar informações sobre localizações espaciais¹¹. Déficits na memória visuo-espacial são observados em doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (DA). A DA é caracterizada por uma perda progressiva das habilidades visuo-espaciais associado a um acúmulo de placas senis, emaranhados neurofibrilares e a uma perda neuronal principalmente em hipocampo e córtex temporal^{12,13}. Outra característica importante no processo neurodegenerativo da DA é o aumento da expressão das proteínas GSK-3 β e Tau em tecido encefálico¹⁴.

No processo de neurodegeneração da DA, a proteína β -amiloide encontra-se em quantidade maior do que o normal e a produção e o acúmulo exacerbados resultam na formação de fibras amiloides e placas senis. Esse processo desencadeia uma cascata de eventos, dentre eles a hiperfosforilação da proteína Tau, que forma emaranhados neurofibrilares, bloqueando a ligação intracelular de proteínas neurotróficas, resultando na morte neuronal. A proteína GSK-3 β , está ligada ao processo de hiperfosforilação da proteína Tau, sendo encontrado um aumento da sua expressão principalmente em regiões corticais e hipocampo^{15,16}.

A relação entre processos neuroinflamatórios e a DA vem sendo estudado na literatura. Evidências sugerem que a neuroinflamação possa desencadear ou agravar a fisiopatologia e a progressão da DA. Microglias ativadas foram encontradas em tecido cerebral de indivíduos com o diagnóstico de DA, demonstrando que houve um possível processo neuroinflamatório no SNC¹⁷. Os estudos, até então, focam na DA como sendo associada a um processo neuroinflamatório em resposta ao depósito de peptídeo β -amilóide. Entretanto, algumas alterações bioquímicas e comportamentais apresentadas após a endotoxemia nos primeiros dias de vida são similares àqueles encontrados no processo fisiopatológico da DA.

Neste sentido, este estudo tem como hipótese principal estudar a relação entre a ativação imune neonatal pela exposição ao LPS e o comprometimento da memória visuo-espacial associada a expressão alterada das proteínas GSK-3 β e Tau em hipocampo e córtex de animais adultos e idosos jovens. Os dados obtidos nesta pesquisa poderão auxiliar no entendimento mais aprofundado do papel da neuroinflamação em um encéfalo imaturo e em desenvolvimento como um dos fatores etiológicos da DA precoce.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Seps e ativação imune neonatal

A seps neonatal caracteriza-se por uma resposta sistêmica decorrente da invasão e multiplicação bacteriana na corrente sanguínea, com evidência ou não de infecção suspeita ou confirmada^{1,2}, sendo definida como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) associada a um processo infeccioso suspeito ou comprovado¹⁸. A SIRS é caracterizada pela alteração de no mínimo dois dos quatro critérios diagnósticos: temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e contagem de leucócitos¹⁹. A seps neonatal configura-se como uma das principais causas de mortalidade e morbidade em recém-nascidos³.

De acordo com os dados da OMS no Brasil em 2015, a seps e outras doenças infecciosas foram responsáveis por aproximadamente 1,3 mortes para cada 1000 nascidos vivos com idade entre 0 e 27 dias, representando 14,3% das mortes ocorridas em recém-nascidos e 7,8 % de todas mortes em crianças com idade entre 0 e 4 anos ²⁰. Observando em um contexto mundial, a seps em recém-nascidos representa aproximadamente 15% do total de mortes de crianças entre 0 e 27 dias ²⁰. A incidência da seps neonatal é ainda mais frequente em prematuros com peso de nascimento inferior a 1.500 gramas, submetidos aos procedimentos invasivos nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). Apesar do número de mortes pela seps neonatal ainda ser elevado, os dados da OMS demonstram uma diminuição do número de mortes ²⁰. Sendo assim, existe a necessidade do acompanhamento a longo prazo na busca de informações sobre possíveis consequências ²⁰.

A seps neonatal pode ser classificada em precoce e tardia. A seps precoce acontece nas primeiras 48 horas de vida e está relacionada a situações pré-natais e periparto e a fatores maternos e gestacionais. O comprometimento é multissistêmico e os patógenos quando identificados, pertencem em sua maioria ao trato genital materno ²¹. A seps tardia, por outro lado, ocorre após as primeiras 48 horas de vida e está relacionada a fatores pós-natais, causados por patógenos não oriundos da mãe e sim por agentes ambientais, por vezes provenientes de procedimentos nas UTINs aos quais os recém-nascidos podem estar expostos como cateteres, tubo endotraqueal, punções venosas, nutrição parenteral, entre outros ²¹. Na seps tardia, a presença de bactérias gram negativas é mais comumente observada¹⁶.

Neste contexto, alguns aspectos podem ser definidos como possíveis fatores de risco para a sepse neonatal tais como, fatores gestacionais e maternos, condições de nascimento e prematuridade e situações relacionados ao ambiente hospitalar ²². Com relação as questões gestacionais e maternas, podem ser considerados fatores de risco, as infecções do trato genito-urinário e colonização por *Streptococcus agalactiae*, assim como, febre materna (> 37,5°C). Neonatos prematuros apresentam um sistema imunológico ainda em desenvolvimento, tornando-se mais facilmente alvo de agentes infecciosos ²³. O peso ao nascer, está associada principalmente a sepse tardia, visto que os mesmos podem precisar de internação hospitalar por um período prolongado, estando expostos aos riscos inerentes ao ambiente por uso de procedimentos, tais como o uso do cateter central de inserção periférica, ventilação mecânica, e uso de nutrição parenteral ²². Sendo então a necessidade de internação considerada um fator de risco significativo, devido as infecções hospitalares, reconhecida como umas das maiores causas de mortalidade neonatal ^{2,5,24,25}.

O diagnóstico da sepse neonatal se torna difícil pois os sinais e sintomas, por vezes, podem ser confundidos com situações própria da idade, decorrentes de uma possível prematuridade. As manifestações clínicas são inespecíficas sendo necessário que se associe fatores de risco materno e neonatais para se suspeitar e iniciar a investigação laboratorial²⁴. No entanto existem algumas manifestações clínicas importantes como: dificuldades respiratórias (taquipnéia, gemência, retrações torácicas, batimentos de asas nasais), apnéia, letargia, febre ou hipotermia, icterícia sem outra causa determinante, vômitos e diarreia ou ainda manifestações cutâneas, incluindo petéquias, abscesso e escleredema ^{21,24}. Na ausência de patógenos, alguns critérios clínicos devem ser considerados para o diagnóstico da sepse neonatal: instabilidade térmica, dificuldade respiratória, hipotonia e convulsões, irritabilidade e letargia, sintomas gastrintestinais, icterícia idiopática, palidez cutânea, sinais de sangramento e até uma avaliação subjetiva ^{21,24}. É importante que o diagnóstico seja feito rapidamente, visto que o quadro pode evoluir para choque séptico e óbito em pouco tempo.²¹

A fisiopatologia da sepse neonatal ainda é um desafio pois trata-se de um processo complexo e multifatorial. A resposta sistêmica pode ter início perante a ação de agentes no organismo, podendo ser estruturais como endotoxocinas gram-negativas que desencadeiam a liberação local ou sistêmica de mediadores inflamatórios⁴ como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , bem como as citocinas anti- inflamatórias

como a IL-10⁵. Estas citocinas estimulam a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), responsável pela conversão de ácido araquidônico para prostaglandina E2 (PGE2), iniciando-se um processo inflamatório.

Na sepse neonatal, em especial na sepse precoce, os níveis de citocinas como IL-6, IL-1 β e o TNF- α apresentam-se elevados, constituindo-se como marcadores iniciais de infecção neonatal. Além disso, a liberação de citocinas medeia a ativação de neutrófilos que iniciam a formação de trombina e o depósito de fibrina^{5,26-28}. Com a ativação de neutrófilos e células endoteliais, as citocinas pró-inflamatórias acabam possibilitando a adesão leucocitária na parede do endotélio³. A produção de óxido nítrico e outros reativos ao nitrogênio e ao oxigênio estão associados ao dano endotelial com alteração das junções entre as células, levando ao edema, a vasodilatação e a perda do controle do tônus^{3,5}.

O sistema imunológico do recém-nascido é mais vulnerável a patógenos invasivos, mostrando-se mais suscetíveis a infecções. A resposta imune inata é um mecanismo de defesa inicial que não necessita de exposição prévia aos patógenos e as células da imunidade inata participam da defesa contra bactérias. A defesa contra patógenos é baseada, em partes, na expressão de receptores com padrão de reconhecimento (PRRs) para estruturas específicas dos microrganismos denominados de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Dentre os PAMPs encontramos os receptores *Toll-Like* (TLR). Os TLR são uma família de proteínas transmembrânicas, que atuam no sistema imune inato, existem diferentes TLR identificados, dentre eles o TLR-4. Os TLR são expressos na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células epiteliais ou no citoplasma de células de diferentes tecidos. No período neonatal, é possível observar alterações qualitativas e quantitativas quanto aos receptores TLR e as células da resposta imune.

O LPS de bactérias gram-negativas reconhecido pelo TLR-4 é um dos principais imunoestimuladores presentes na parede bacteriana que induz a ativação de proteínas intracelulares e a translocação de diferentes fatores de transcrição essenciais para a expressão dos genes e assim medeiam a resposta inflamatória²⁹. O equilíbrio existente entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, permite uma resposta imune efetiva e ao mesmo tempo tem a função de proteger o hospedeiro de uma resposta inflamatória excessiva³⁰

Em linhas gerais, a sepse neonatal está associada a uma resposta inflamatória sistêmica e pode causar comprometimento do tecido encefálico em desenvolvimento³¹⁻³³. Um grande número de células imunes efetoras são mobilizados para a circulação. Concomitantemente, estas células imunes secretam citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-1 β que atravessam facilmente a BHE no parênquima cerebral³⁴. Em sequência, as citocinas pró-inflamatórias podem ativar a micróglia, célula imune residente do SNC, e iniciar uma complexa cascata inflamatória incluindo a liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas ao oxigênio (ERO) e iniciar uma excitotoxicidade glutamatérgica^{35,36}.

1.1.2 Neuroinflamação

O SNC é um órgão imunologicamente privilegiado. É normalmente protegido por três elementos estruturais: A BHE com a interface entre o encéfalo e os vasos sanguíneos; a barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (LCR), formada pelo plexo coroide e a membrana aracnoide com os vasos sanguíneos e o LCR; e a barreira sangue-aracnoide, que é a interface dos vasos sanguíneos com a camada do epitélio da aracnoide subjacente à dura-máter. Essas barreiras são estruturas especializadas do SNC que controlam e regulam a homeostase³⁷

A BHE é formada pela membrana basal do endotélio, pericitos, astrócitos, que, em conjunto com as junções Oclusivas, dificultam o contato entre o SNC e órgãos periféricos. Moléculas presentes na circulação sistêmica, como as citocinas, têm dificuldade de penetrar no SNC. Estudos sugerem que as citocinas podem estimular nervos periféricos, que podem ativar respostas inflamatórias no SNC. Citocinas periféricas podem influenciar a resposta inflamatória cerebral a partir das áreas desprovidas de BHE. A inflamação cerebral também pode ser potencializada por mediadores inflamatórios produzidos pelo endotélio vascular ativado por citocinas periféricas. Neste contexto acredita-se que a desregulação da BHE causa a exposição do SNC a substâncias nocivas, ou tóxicas, envolvidas na morte neuronal^{38,39}. Evidências indicam que a infecção bacteriana, estimula vias inflamatórias, que são capazes de causar danos no cérebro dos neonatos, mesmo na ausência de entrada bacteriana direta no SNC⁴⁰.

Durante o processo neuroinflamatório, as alterações no SNC podem envolver mecanismos patogênicos e a resposta imune inata do hospedeiro. O sistema imune

inato identifica os patógenos através de famílias de receptores. Os TLR e receptores de produtos finais de glicosilação avançada (RAGE) são receptores presentes nas células do sistema imune e reconhecem padrões associados à patógenos conhecidos como PAMPs, exemplos de PAMPs são as endoxinas presentes na membrana dos organismos gram-negativos. Os RAGE são capazes de se ligar a uma variedade de ligante com diferentes propriedades e origens. A sua ativação contribui para a ativação da microglia e para o estresse oxidativo, desencadeando um processo de morte neuronal. Além disso, a ativação microglial também foi associada a um aumento da expressão de TNF- α IL-1 β , IL-6 e IL-10 no tecido encefálico após a inflamação sistêmica. Neste contexto, relata-se que a neuroinflamação pode contribuir significativamente para a progressão de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, a DA, a esclerose múltipla, a doença de Huntington e a esclerose lateral amiotrófica⁴¹⁻⁴⁵.

Durante o processo de desenvolvimento, a ativação imune no SNC, envolve a micróglia e astrócitos, que constituem as células imunes residentes e desempenham um papel importante na regulação da homeostase ⁴⁶. Os astrócitos desempenham a função de proteção do tecido neuronal como a promoção do reparo celular, modulação de neurotrofinas, ajudam a reestabelecer a permeabilidade da BHE e também promovem a neurovascularização e a neurogenese ⁴⁶. No entanto, estímulos excessivos aos astrócitos podem resultar na falência da reparação da BHE, infiltração leucocitária, desmielinização e morte de células oligodendrocitas ⁴⁷. Similarmente, após a ativação da micróglia, a mesma produz metabolitos que provocam a morte neuronal e impedem a neurogenese ⁴⁸. O encéfalo dos neonatos são mais vulneráveis a alterações decorrentes a uma resposta inflamatória sistêmica, como a ativação microglial e astrocitária, e as alterações relacionadas a estas cascatas podem persistirem por um longo prazo⁴⁹.

As alterações induzidas pelo LPS no desenvolvimento neurológico resultam do fato da migração neuronal, a gliconeogênese e a mielogênese ocorrerem numa fase tardia gestacional que predominam nas duas primeiras semanas de vida pós-natal. O LPS, realiza a indução de células imunes residentes no cérebro, como a micróglia que libera mediadores inflamatórios. O desencadeamento da produção de citocinas pró-inflamatórias através do LPS, em especial em células imaturas, influenciam na neurodegeneração ⁵⁰⁻⁵².

Estudos apontam que o processo neuroinflamatório em neonatos pode estar associado a déficits neurológicos a longo prazo⁵³⁻⁵⁵, o que reforçam a possível correlação entre a sepse neonatal e o atraso no desenvolvimento neuropsicomotor⁵⁶. Em um estudo realizado por Stoll e colaboradores (2004) foi possível observar a associação entre a sepse neonatal e déficits cognitivos. Após a avaliação de crianças entre 18 e 22 meses de idade, foi possível observar que aquelas que apresentaram sepse no período neonatal, demonstraram maior comprometimento das funções cognitivas⁵⁷. Em um modelo experimental, foi observado que camundongos expostos ao LPS no período neonatal apresentaram alterações no aprendizado e na memória quando adultos⁷. Neste contexto, Selkoe e colaboradores (2000) demonstraram que o acúmulo dos mediadores inflamatórios em tecido encefálico é normalmente acompanhado de perda neuronal, principalmente em áreas corticais e hipocampais, resultando na perda progressiva das funções cognitivas⁵⁸.

1.1.3 Processo de Memória e Aprendizado

As funções cognitivas são fundamentais para o desenvolvimento do ser humano. Na sepse algumas dessas funções cognitivas podem sofrer alterações, trazendo prejuízos significativos. No caso da sepse neonatal, esses prejuízos podem apresentar-se a longo prazo.⁷

A memória e a aprendizagem são duas das funções cognitivas mais importantes e também mais complexas. Apesar de parecem funções simplistas, estão envolvidas em processos cerebrais diversos, que interagem entre si, não havendo uma única estrutura encefálica ou mecanismo neural que seja responsável por todo o processo de aprendizado e memória. Este processo de interação possibilita a armazenagem e recuperação de informações⁵⁹.

A memória consiste em um processo cognitivo que pode ser definida como a capacidade de aquisição, formação, conservação e evocação de informações, sendo este um sistema complexo e multifacetado, que envolve uma variedade de mecanismos neurais. A memória serve de base para a aprendizagem, podendo ser definida como uma mudança de comportamento que apresenta como principal característica a aquisição de uma determinada informação^{11,60,61}.

O processo de memória e aprendizado pode ser dividido em aquisição, armazenamento e evocação. Apesar de serem explicados separadamente, eles

acontecem de maneira interligada. A aquisição tratar-se do momento que a informação chega até o SNC por meio de estruturas sensoriais, que transportam a informação ao encéfalo. Ou seja, existe um estímulo que é transmitido pelos órgãos receptivos (visão, audição, tato) e que chegam ao sistema nervoso através dos nervos sensitivos^{60,62}. A consolidação ou armazenamento, é o momento onde a informação será armazenada e onde haverá a retenção dessa informação por um determinado período de tempo. A memória utiliza o armazenamento como uma forma de facilitar atividades cognitivas complexas como a aprendizagem, que consiste no armazenamento de informações como consequência de uma experiência ou da prática, produzindo assim, uma alteração de comportamento real ou potencial¹¹.

Este armazenamento pode acontecer de duas maneiras: através de alterações eletrofisiológicas e/ou através de alterações bioquímicas. Nas alterações eletrofisiológicas, a retenção da informação é realizada apenas por um tempo determinado. Isso acontece nos casos de memória sensorial e memória de trabalho¹¹. Nas alterações bioquímicas, há alterações estruturais e funcionais. As estruturais, acontecem devido a formação de novas espinhas dendríticas ou com a formação de novos prolongamentos axonais. Já nas alterações funcionais, acontece a formação de novos canais iônicos que otimizam a transmissão sináptica⁶³. A consolidação acontece no hipocampo, visto que este parece ser um depósito transitório de memórias, onde ocorre a transição de elementos registrados recentemente para um arquivo mais permanente^{60,61}.

Por último, ocorre o processo de evocação, que consiste na recuperação da informação que foi armazenada⁵⁹. A evocação acontece no córtex pré-frontal, que envolve a organização dos traços de memória de maneira sequenciada e coerente com o tempo. A recuperação pode acontecer por dois tipos: pelo reconhecimento que consiste em um estímulo previamente conhecido e armazenado - onde existe uma familiaridade com a situação e a recordação - onde não existe um estímulo previamente conhecido, não havendo uma familiaridade presente^{59,60}.

Quanto ao tempo de armazenamento a memória pode ser definida como memória de curto prazo, memória de trabalho e memória de longo prazo. A memória de curto prazo retém temporariamente as informações, que podem durar de segundos a horas e que podem ser vulneráveis a perturbações, abrigando uma quantidade limitada de dados¹¹.

A memória de trabalho diz respeito a habilidade para manter e manipular informações, que são mantidas ativas por um curto período de tempo, no máximo poucos minutos, apenas enquanto se está fazendo uso dela, entanto a informação está sendo processada, com o objetivo de selecionar um plano de ação e realizar a atividade pretendida ¹¹. A manipulação das informações é crucial para a expansão do conhecimento, sendo assim, conseqüentemente o desempenho da memória de trabalho é essencial para o processo de aprendizagem. No entanto, a memória de trabalho tem uma outra função fundamental, que é a de realizar a comparação das informações novas com as que já estão armazenadas na memória de longo prazo. Sendo assim, a memória de trabalho trata-se de um gerenciador, que organiza as informações de maneira ordenada e sequencial, possibilitando que as ideias possam estar em acordo com a realidade ^{61,64}. O funcionamento inadequado no processamento de um dos componentes de organização da memória de trabalho pode causar dificuldade no processo da aprendizagem ⁵⁹.

As informações que passam pela memória de curto prazo ou serão perdidas ou irão ser armazenadas na memória de longo prazo ⁶⁰. A memória de longo prazo, possui a capacidade de armazenar informações por longos períodos, desde que esta informação seja constantemente reforçada ao longo do tempo. A capacidade de aprender algo novo e armazenar as informações na memória de longo prazo é parte do desenvolvimento normal. A formação da memória do longo prazo envolve uma série de processos no hipocampo e em outras estruturas cerebrais¹¹. A memória de longo prazo, pode ser dividida em memória declarativa e não- declarativa ^{11,60}.

A memória declarativa é a capacidade de armazenamento e evocação consciente das informações. É sempre explícita, ou seja, se caracteriza pela memorização de eventos e fatos que estão relacionados as experiências vividas pelo indivíduo. O hipocampo é uma das estruturas cerebrais envolvidas na formação da memória declarativa⁶⁵. Ele é necessário para a aquisição desses tipos de memórias e lesões nessa região impedem os indivíduos de estabelecerem novas memórias explícitas. Neste contexto, a memória declarativa se divide em episódica e semântica¹¹. A memória episódica está relacionada a eventos pessoais e específicos da experiência de cada indivíduo. A memória semântica, se refere ao registro e retenção dos conhecimentos e conteúdos em geral, arquivando os conceitos e a função do significado que cada informação tem. Esta memória não guarda momentos e sim fatos⁶⁰.

A memória não-declarativa, está relacionada a capacidade de adquirir habilidades perceptivas motoras ou cognitivas através da repetição ¹¹. Essas memórias, são por vezes adquiridas através de condicionamento, ou seja, uma associação perante um estímulo específico (comportamento por exemplo) e uma consequência como resposta. As memórias motoras podem ser os melhores exemplos de memórias não-declarativas pois elas são de difícil aprendizagem, no entanto, com a frequente repetição, acabam por se tornarem automáticas e inconscientes ⁶⁰.

A memória espacial é uma memória declarativa episódica essencial para a realização de muitas tarefas diárias que envolvem informações visuais e espaciais. A memória espacial apresenta uma limitada capacidade de armazenamento e é fundamental para a formação de ideias mentais⁶¹. Ela envolve habilidades para codificar, armazenar e recuperar informações sobre localizações espaciais, rotas e tem a função de reter e processar a identidade e a localização espacial de um objeto, tornando-se essencial para a realização de muitas atividades. O hipocampo e o córtex são áreas envolvidas na criação e armazenamento das memórias declarativas episódicas, estando diretamente relacionadas a memória visuo-espacial⁶⁶⁻⁷⁰. Os déficits na memória visuo-espacial podem ser observados em indivíduos com diagnóstico de doenças neurodegenerativas como a DA.

1.1.4 Neurodegeneração

A neurodegeneração caracteriza-se pela perda crônica progressiva da estrutura e funções dos materiais neuronais, resultando em deficiências funcionais⁴¹. Pode acometer desde neurônios, sinapses até ocasionar morte neuronal. As interações imunes no processo neurodegenerativo podem ocorrer no interior dos neurônios, no tecido encefálico ou no ambiente sistêmico através de citocinas, neurotransmissores, interações célula-célula e nervos periféricos. Alterações em qualquer um desses níveis de organização podem modular processos neurodegenerativos no SNC⁶⁰. As doenças neurodegenerativas são caracterizadas por uma morte neuronal prematura em regiões focais do cérebro. São condições debilitantes que afetam pessoas de todas as idades, caracterizada por uma degeneração progressiva das células neuronais e resultando no comprometimento das funções superiores¹¹.

Dentro dos processos degenerativos, a demência se caracteriza por um declínio de memória associado ao déficit de pelo menos uma outra função cognitiva (linguagem, percepções ou funções executivas) com intensidade suficiente para interferir no desempenho social ou profissional do indivíduo. Este declínio não pode ser relacionado ao processo de envelhecimento normal^{11,71}. Dentre os tipos de demência, a principal é a DA, sendo essa uma doença neurodegenerativa progressiva¹⁵ que se caracteriza por uma deterioração global, progressiva e irreversível de diversas funções cognitivas (memória, atenção, concentração, linguagem, pensamento, entre outras) e associada a déficits na organização espacial, no comportamento e na personalidade⁷². Um dos primeiros sintomas consiste na perda da memória episódica para eventos recentes, no entanto, o déficit na memória evolui e progride, comprometendo também a memória semântica e de trabalho.

Na DA, as lesões características podem levar a uma degeneração difusa das sinapses no hipocampo, no córtex cerebral e em algumas estruturas subcorticais, que ultrapassa o mínimo necessário para a função mnemônica¹¹. A maioria dos casos começa a se manifestar por volta de 65 anos, no entanto, podem, em alguns casos, se manifestar de maneira precoce, por volta dos 50 anos de idade¹⁵.

O diagnóstico da DA definitivo é apenas obtido após a análise histopatológica de materiais decorrentes da autópsia. A análise revela perda neuronal no córtex cerebral e degenerações sinápticas intensas, tanto no hipocampo quanto em nível neocortical. Também é possível identificar depósitos extracelulares do peptídeo β -amiloide, placas senis e emaranhados neurofibrilares de proteína Tau hiperfosforilada. Os emaranhados neurofibrilares e as placas senis podem estar presentes nos cérebros normalmente senis mas em menor quantidade e com distribuição menos extensa⁷³.

No processo fisiopatológico da DA, à medida que as células cerebrais vão sofrendo uma redução de tamanho e número, há formação no seu interior de filamentos neurofibrilares, criando placas senis no espaço extracelular. Esta situação dificulta a sinapse entre as células e facilita os processos de apoptose. Além disso, alguns indícios neuropatológicos, dentre eles a perda neuronal, o acúmulo de emaranhados neurofibrilares correspondentes aos depósitos intracelulares da proteína Tau hiperfosforilada e o processamento anormal da proteína precursora de β -amiloide (APP), levam ao depósito do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) e, portanto, à

formação das placas senis. Tanto o A β quanto a proteína Tau estão envolvidas nos déficits das funções cognitivas como memória e aprendizagem ^{11,15}.

A APP representa uma das proteínas mais abundantes no SNC¹⁵. Ela sofre uma clivagem após sua síntese, dando origem ao fragmento denominado proteína β -amiloide, composto de 42 aminoácidos⁷⁴. Esse fragmento é mais amiloigênico do que a proteína original pois tem a propriedade de agregação protéica na parte extracelular dos neurônios. Portanto uma vez que se encontre em quantidade maior que a normal, o acúmulo resultará na formação de fibras amiloides gerando placas senis¹⁵. O acúmulo de A β desencadeia eventos neurotóxicos, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, resposta neuroinflamatória anormal, diminuição da neuroplasticidade e neogênese e hiperfosforização da proteína Tau^{15,72}. Estes eventos acabam ampliando a neurotoxicidade da A β , culminando na morte neuronal ¹⁵.

A proteína Tau faz parte da família das proteínas associadas aos microtúbulos (MAP). Encontrada na maioria dos tecidos, é expressa no SNC e periférico¹⁵. A principal função das MAPs é estabilizar os microtúbulos pela agregação da tubulina⁷⁵. Nas doenças degenerativas, a proteína Tau apresentam-se na forma de filamentos anormais insolúveis e hiperfosforilados. Ao estar anormalmente fosforilada, é menos capaz de polimerizar a tubulina e provocar uma ruptura do citoesqueleto celular e por consequência, morte neuronal ⁷⁶. Todas as alterações na proteína Tau modificam o transporte axonal, que é vital e necessário para a manutenção da homeostase neuronal. A hiperfosforilação da Tau propicia a formação de agregados, bloqueando a ligação intracelular de proteínas neurotróficas assim como outras proteínas funcionais, resultando em perda ou declínio do transporte axonal nos neurônios. Essa interrupção do transporte dos potenciais de ação pelos axônios afetados causam disfunção e morte celular ¹¹.

Algumas proteínas-quinases e fosfatases estão envolvidas na regulação da fosforilação da Tau, dentre estas, a enzima GSK-3 β sendo a mais importante tau-quinase nos neurônios¹⁵. Tais enzimas são capazes de fosforilar a Tau *in vitro* e foram detectados nos estratos celulares de tecido cerebral de indivíduos com DA. A GSK-3 β exerce papel importante no metabolismo do glicogênio, na ativação de fatores de transcrição e é uma enzima chave na regulação do metabolismo celular, incluindo a fosforilação da proteína Tau¹⁵. A GSK-3 β desempenha papel importante na fisiopatologia da DA⁷⁷ sendo encontrada em níveis aumentados no hipocampo ^{16,78}. A desregulação do metabolismo da GSK-3 β pode levar a um aumento da atividade

dessa proteína, o que pode ser um evento patológico no início da DA, provocando eventos que culminam na produção aumentada do A β e na fosforilação da Tau ⁷⁹. Além disso, a GSK-3 β está envolvida nos déficits de aprendizagem e memória, nas respostas inflamatórias e no processo de neurodegeneração ⁷⁷. A GSK-3 β também é um mediador chave da apoptose ⁸⁰ e, portanto, pode contribuir diretamente para a perda neuronal na DA.

As proteínas A β , Tau e GSK-3 β estão envolvidas no processo de neurodegeneração na DA, no entanto, o processo fisiopatológico é complexo e necessita ser ainda mais estudado. Os processos presentes na DA não são de causa única, embora a morte neuronal seja uma característica essencial, os mecanismos envolvidos ainda permanecem em observação. É importante pensar que além na morte neuronal, a atividade de respostas a proteínas tóxicas podem ser uma possibilidade promissora⁷². Neste contexto, existem evidências de que a neuroinflamação possa estar envolvida na patogênese da DA ⁸¹. Este aspecto é demonstrado em alguns estudos onde o dano neuronal associado a DA pode ser resultado do processo de inflamação em áreas do SNC. Pesquisas mostram que em cérebros de indivíduos com diagnóstico de DA, houve um aumento nos níveis de mediadores inflamatórios ^{65,81}.

Estudos demonstraram que crianças que desenvolveram infecções sistêmicas recorrentes apresentaram déficits cognitivos durante a infância e a vida adulta⁸². Há evidências que sugerem uma possível relação entre a sepse e a patogênese da DA, visto que a sepse está associada ao estresse oxidativo, ao aumento dos níveis de citocinas inflamatórias e ao óxido nítrico, podendo causar disfunção neuronal e neurodegeneração^{83,84}. Em um estudo utilizando modelo animal, observou-se que um grupo de animais expostos a endotoxemia por LPS, apresentaram consequências a longo prazo, como déficit de memória, déficits comportamentais e perda neuronal em regiões do hipocampo. Também encontrou-se um número reduzido de células no córtex pré-frontal, o que pode ocasionar desorientação e maior dificuldade na execução de tarefas mais complexas⁸⁵.

O estudo de Semmler e colaboradores (2007), reforça que a endotoxemia pode levar a perdas substanciais de neurônios e inervação colinérgica em diferentes regiões do cérebro até 90 dias após a exposição endotoxêmica, o que poderia justificar os déficits nas funções cognitivas e comportamentais ⁸⁵. Animais submetidos a endotoxemia no período neonatal apresentaram comprometimento da memória de

habituação, aversiva e de reconhecimento de objetos quando adultos, demonstrando que o processo neuroinflamatório no período de desenvolvimento pode ter consequências a longo prazo⁷. Apesar da existência de evidências de que as doenças infecciosas sistêmicas podem fazer parte do processo de neurogeneração, estas ainda são inconclusivas, no entanto, há fortes evidências que apontam a necessidade de buscar maiores investigações⁸⁶.

1.1.5 Modelo animal de ativação imune neonatal

O LPS é uma endotoxina bacterina que induz efeitos inflamatórios e pró-coagulantes. É um componente da membrana plasmática de bactérias gram-negativa e reconhecido como principal fator responsável por manifestações tóxicas de infecções gram-negativas severas e inflamação generalizada^{87,88}.

A ativação imune neonatal, em animais é provocada pela exposição endotoxêmica ao LPS. O LPS é reconhecido pelo sistema imune como um agente patogênico associado aos PAMPs. Ele também se liga ao TLR-4 em monócitos e macrófagos, constituindo com esta ligação uma cascata de eventos que conduz a inflamação²⁹. A ligação entre o TLR-4 e o LPS resulta no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, translocação do fator nuclear NF- κ B⁸⁹ e posteriormente a transcrição de genes que codificam mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8^{29,30}.

Uma vez que o LPS entra em contato com o organismo, seja a partir de uma bactéria gram-negativa ou pela administração direta, inicia-se uma série de respostas no organismo, atuando em células como monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais⁹⁰. No SNC, o LPS desencadeia um conjunto de modificações microgliais culminando no aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios para induzir um estado neuroinflamatório²⁹.

Estudos em modelos animais, em sua maioria, são realizados por indução LPS em camundongos por demonstrarem uma resposta exacerbada as citocinas pró-inflamatórias no SNC e apresentarem prejuízos comportamentais e disfunções cognitivas semelhantes a sepse. A indução de endotoxemia por LPS nas primeiras semanas de vida reproduz algumas das complicações observadas em neonatos com sepse neonatal⁹¹.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a memória espacial e a expressão das proteínas Tau e GSK-3 β em tecido encefálico de animais com 60, 120 e 180 dias de vida após ativação imune neonatal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a memória espacial em animais com 60, 120 e 180 dias de vida após ativação imune no período neonatal

Quantificar a expressão das proteínas Tau e GSK-3 β em hipocampo e córtex de animais com 60, 120 e 180 dias de vida após ativação imune no período neonatal

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Esta pesquisa é do tipo experimental pré-clínica. Foi realizada no Laboratório de Neurociências Experimental (LANEX) e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), campus Pedra Branca.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para a realização deste estudo foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos: LPS (026:B6L; E. Coli – Sigma Aldrich; Brasil); tampão fosfato salina (PBS - Laborclin, Brasil); labirinto aquático de Morris adaptado para camundongos (tanque circular com 134 cm de diâmetro e 40 cm de altura, plataforma quadrada de acrílico com dimensões de 15 x 15 cm de largura e 28,5 cm de altura), gel de poliacrilamina (SDS-PAGE 12 %); membrana PVDF em sistema semi-seco (Biorad); anticorpo primário policlonal de coelho, anti-beta-actina, anti-rabbit e anti-mouse infravermelho (Uniscience; São Paulo, Brasil); fotodocumentador (odyssey LI-COR Biosciences, Brasil); pentobarbital (thiopentax – tiopental sódico; Cristália, Brasil); tampão de lise RIPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); deoxicolato de sódio, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) e coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA); gel para membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA); GSK-3 β (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA); Tau (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA); β -actina-HRP (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); anticorpo secundário conjugado com peroxidase (cabra anti-coelho-HRP ou cabra anti-camundongo-HRP; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA); kit de quimiluminescência (ECL; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA); programa Image Lab (versão 4.1; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados 12 (doze) camundongos adultos C57BL/6 sendo 6 machos e 6 fêmeas, pesando entre 18 e 22g, totalizando 6 casais provindos da Universidade

Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram acasalados (um macho para uma fêmea) e a prole utilizada para este estudo. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, ciclo de claro e escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e comida e água livres. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais foram acondicionados no Biotério Experimental do Laboratório de Neurociência Experimental (LANEX) localizado no campus Pedra Branca, no Bloco I2.

O número de animais por grupo foi calculado em $n=8$. A fórmula empregada para o cálculo foi a equação $n/\text{grupo}=2[(Z\alpha/2 + Z\beta) \times d/\Delta]^2$, para comparação de duas médias, considerando-se o poder de teste de 80%, o nível de significância de 5%, o desvio padrão de 12,5% a partir de registros de estudos anteriores e o valor da diferença a ser detectada igual a 18%. Entende-se, portanto, que o número de pelo menos 8 animais foi utilizado em cada grupo experimental para garantir que as conclusões dos experimentos sejam válidas, dentro de um risco aceitável de não estar observando diferenças onde elas existam tampouco estar observando diferenças onde elas não existam.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Ao completarem dois dias de vida, a prole foi retirada da caixa para a exposição à endotoxemia (ou PBS). A endotoxemia foi induzida com uma única administração subcutânea de $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS. O LPS foi preparado com o auxílio de PBS para diluição. Os animais controles receberam apenas PBS no mesmo volume administrado no LPS⁷⁰. A mortalidade foi avaliada durante todo o experimento. A literatura relata que este modelo experimental é o que mais se assemelha a sepsé neonatal, pois há mortalidade de 60% nos primeiros dias de vida⁹². Para o estudo, foram utilizados um total de 62 animais, sendo 24 submetidos a injeção de PBS e 38 (24 + 60%) expostos ao LPS. Logo em seguida, retornam as suas caixas até completarem 21 dias de vida, quando foram separados por sexo e alocados em caixas próprias, estas contendo 5 animais cada. Neste momento, os animais foram divididos seis grupos experimentais: PBS 60 dias, PBS 120 dias, PBS 180 dias, LPS 60 dias, LPS 120 dias e LPS 180 dias.

Ao completarem 60 (grupos PBS 60 dias e LPS 60 dias), 120 (grupos PBS 120 dias e LPS 120 dias) e 180 (grupos PBS 180 dias e LPS 180 dias) dias de vida, a memória visuo-espacial foi avaliada através do teste do Labirinto Aquático de Morris.

Após o teste, os animais foram submetidos à Morte Indolor Assistida (MIA), recebendo injeção de uma dose excessiva de pentobarbital de 80 mg/kg via intraperitoneal de acordo com a resolução 1000, de 12/05/2012 – conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), sob a supervisão de médico veterinário responsável. As estruturas hipocampo e córtex foram dissecados, processados e armazenados em freezer -80°C para avaliação da expressão das proteínas Tau e GSK-3 β através da técnica Western Blot.

Figura 1: Delineamento do estudo



3.5 ENSAIOS/ TESTES/ TÉCNICAS

3.5.1 Labirinto aquático de Morris

O Labirinto aquático de Morris tem como objetivo avaliar o aprendizado e a capacidade de aquisição de memória espacial, utilizando dicas ambientais. O animal deve aprender a usar as dicas fixadas na parede na sala para navegar até a plataforma submersa. Durante os treinos mede-se a latência por segundos para encontrar a plataforma submersa. O tempo que o animal tem para encontrar a plataforma, cada vez que é colocado na água, é de 60 segundos. Se o animal não encontrar a plataforma, ele é gentilmente conduzido até ela pelo experimentador e uma vez na plataforma, ele permanece um período sobre ela (10 segundos). Os treinos acontecem nos dois dias que antecedem o teste, consistindo em seis baterias. No momento do teste, a plataforma é removida e o animal é colocado na piscina apenas uma vez, onde, durante um período determinada, ficará livre para nadar. No teste, avaliou-se o tempo gasto no quadrante em que a plataforma se encontrava.

Para realização deste teste, foi utilizado um tanque circular localizado no centro de uma sala de 12 m² com uma janela superior no ponto sul, sendo os treinos

e os testes realizados a partir das 9 horas da manhã. Para a realização dos treinos, foi adicionado no tanque água até que o nível desta ultrapassasse 2 cm a altura da plataforma. Em seguida, a água foi deixada opaca com acréscimo de amido de milho, assim, dificultando a visibilidade da plataforma. A aquisição da memória visuo-espacial foi avaliada após o término do teste através de filmagens e analisados pelo sistema Any-Maze®⁹³.

3.5.2 Imunoeletroforese – *Western Blot*

3.5.2.1 Preparação das amostras

Amostras de hipocampo e de cortex total foram obtidas e armazenadas a -80 °C até sua utilização. As amostras foram homogeneizadas manualmente (com auxílio de micropistilos) em tampão de lise RIPA [composto por Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e PBS], acrescido de ortovanadato de sódio 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM e coquetel de inibidores de proteases 1% e em seguida, incubados em gelo por 30 minutos. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante (correspondente ao extrato total) foi coletado, sendo uma alíquota separada para a dosagem de proteína em cada amostra, a qual foi determinada através do método de Bradford. Ao restante do sobrenadante, foi adicionado o tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%) na proporção de 1:6. As amostras foram fervidas (95 °C; 5 min) e permaneceram armazenadas a -80 °C até o momento da eletroforese.

3.5.2.2 Separação de proteínas e imunodeteção

Para a realização dos ensaios de imunodeteção, todas as amostras foram mantidas em gelo até o completo descongelamento. Após, quantidades iguais de proteínas para cada amostra (30 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (10%). A etapa de transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de PVDF foi realizada sob as seguintes condições: 90 V e 30 mA por 1 h e 30 min. Em seguida, as membranas foram coradas (vermelho de Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%) para visualização das proteínas. Após

lavagens em TBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, Tween-20 0,05%), para a retirada do excesso do corante, as membranas foram imersas em solução de TBS-T contendo BSA 5%, por 1 h a temperatura ambiente, com o objetivo de bloquear as reações inespecíficas. Na sequência, as membranas foram incubadas durante 14-16 h (2-8 °C), sob agitação, com os anticorpos primários, diluídos em TBS-T contendo BSA 1%, contra as proteínas de interesse: GSK-3 β (1:1000) TAU (1:1000) e β -actina-HRP (1:45000). Ao término do período de incubação, as membranas foram lavadas durante 30 minutos com TBS-T, e em seguida, incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:10000, cabra anti-coelho-HRP ou cabra anti-camundongo-HRP) (exceto para anti- β -actina-HRP) por 1 h em temperatura ambiente. Após esse período, uma nova lavagem de 30 minutos com TBS-T foi então realizada seguida pela exposição das membranas durante 1 minuto ao kit de quimiluminescência e revelação através de um fotodocumentador. As análises quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria com o auxílio do programa Image Lab. Os valores foram normalizados utilizando os valores obtidos para a β -actina, e expressos graficamente como unidades arbitrárias.

3.6 VARIÁVIES DE ESTUDO

Quadro 01 – Variáveis de estudo

| Variável | Tipo | Natureza | Proposta de Utilização |
|--------------------------------------|--------------|---|------------------------|
| Exposição ao LPS | Independente | Qualitativas Nominal Dicotômica | Sim ou não |
| Idade do animal | Independente | Qualitativas Nominal Policotômica | Dias |
| Memória visuo-espacial | Dependente | Quantitativa Continua | Segundos |
| Expressão da proteína GSK-3- β | Dependente | Quantitativa Continua | Unidades arbitrárias |
| Expressão da proteína TAU | Dependente | Quantitativa Continua | Unidades arbitrárias |

3.7 PROCEDIMENTO E ANÁLISE DE DADOS

Após a coleta dos dados foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para caracterização dos dados. Os dados dos parâmetros avaliados foram considerados paramétricos e foram apresentados como a média \pm desvio padrão da média. A análise estatística dos dados entre os grupos foi realizada por meio o teste t de student para a amostras independentes. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina, seguindo os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (do inglês *Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos EUA, NIH), assim como a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA (2016), do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado sob o nº. de protocolo 17.003.4.01. IV (Anexo 1).

4. RESULTADOS

4.1 MEMÓRIA VISUO-ESPACIAL

A figura 1 demonstra os resultados obtidos no teste do labirinto aquático de Morris. O tempo de permanência no quadrante onde estava localizada a plataforma foi avaliado na sessão de teste.

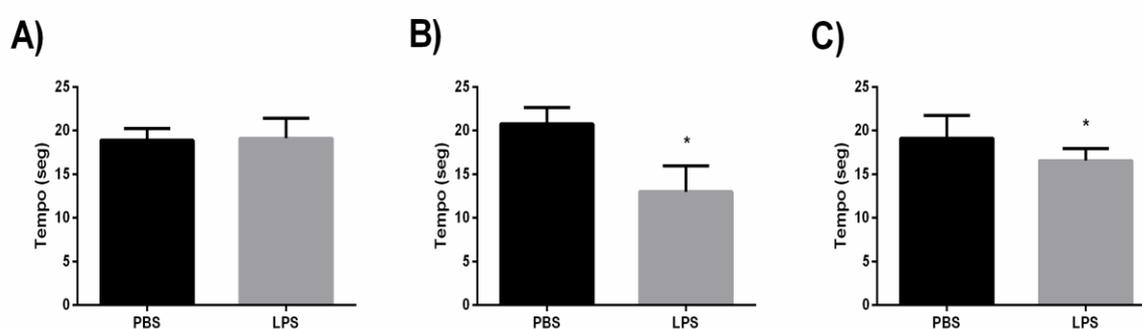


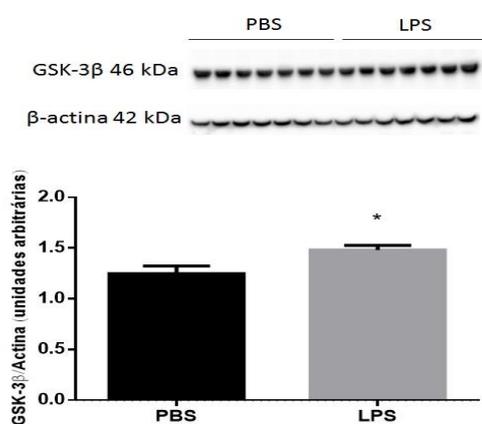
Figura 1. Labirinto aquático de Morris. As figuras A, B e C demonstram os resultados referentes a 60, 120 e 180 dias após a ativação imune neonatal, respectivamente. Os dados são expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$ vs. PBS. $n = 7-8$

Foi observado que após 60 dias (figura 1A) da ativação imune neonatal, não foi encontrado diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($p = 0.794$). Entretanto, após 120 (figura 1B) e 180 (figura 1C), foi observado uma diminuição significativa no tempo de permanência no quadrante onde estava localizada a plataforma ($p < 0.0001$ e $p = 0.0403$, respectivamente).

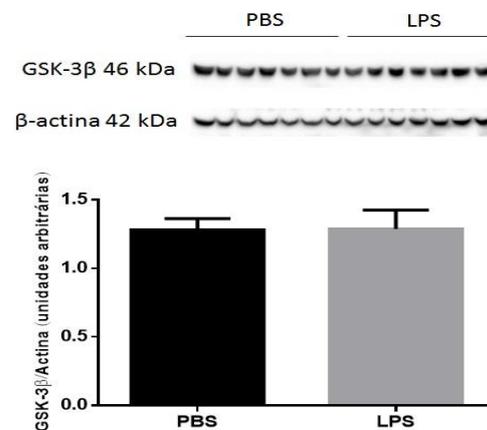
4.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNA GSK-3 β e TAU APÓS 60 DIAS DA ATIVAÇÃO IMUNE NEONATAL

A Figura 2 demonstra os resultados da expressão das proteínas GSK-3 β no hipocampo (Figura 2A) e no córtex (Figura 2B) e Tau no hipocampo (Figura 2C) e córtex (Figura 2D) em animais que receberam LPS ou PBS aos 2 dias de vida e avaliados quando completaram 60 dias de vida.

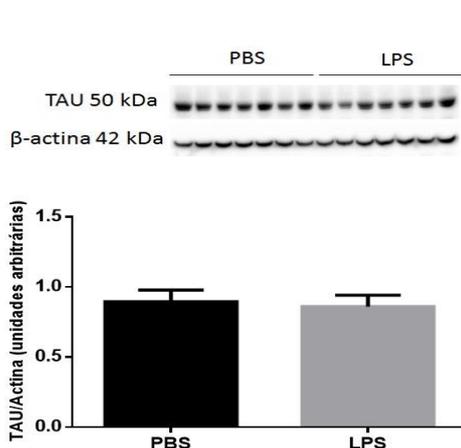
2A



2B



2C



2D

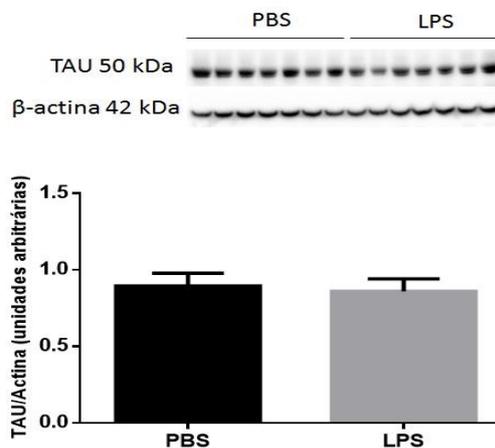


Figura 2. Expressão da proteína GSK-3β no hipocampo (Figura 2A) e no córtex (Figura 2B) e da proteína Tau no hipocampo (Figura 2C) e córtex (Figura 2D) de animais 60 dias após a ativação imune neonatal. Os dados são expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$ vs. PBS. $n = 7-8$

Foi observado que após 60 dias da ativação imune neonatal houve um aumento significativo da expressão da proteína GSK-3β no hipocampo de animais que receberam LPS quando comparados aos animais que receberam PBS ($p < 0.0001$; Figura 2A). Entretanto, não houveram alterações estatisticamente significativas nas avaliações das expressões da proteína GSK-3β no córtex (Figura 2B) e da proteína Tau em hipocampo (Figura 2C) e em córtex (Figura 3D) ($p > 0.05$) após 60 dias da ativação imune neonatal.

4.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNA GSK-3 β e TAU APÓS 120 DIAS DA ATIVAÇÃO IMUNE NEONATAL

A Figura 3 expressa os resultados da expressão das proteínas GSK-3 β no hipocampo (Figura 3A) e no córtex (Figura 3B) e Tau no hipocampo (Figura 3C) e córtex (Figura 3D) em animais que receberam LPS ou PBS aos 2 dias de vida e avaliados quando completaram 120 dias de vida.

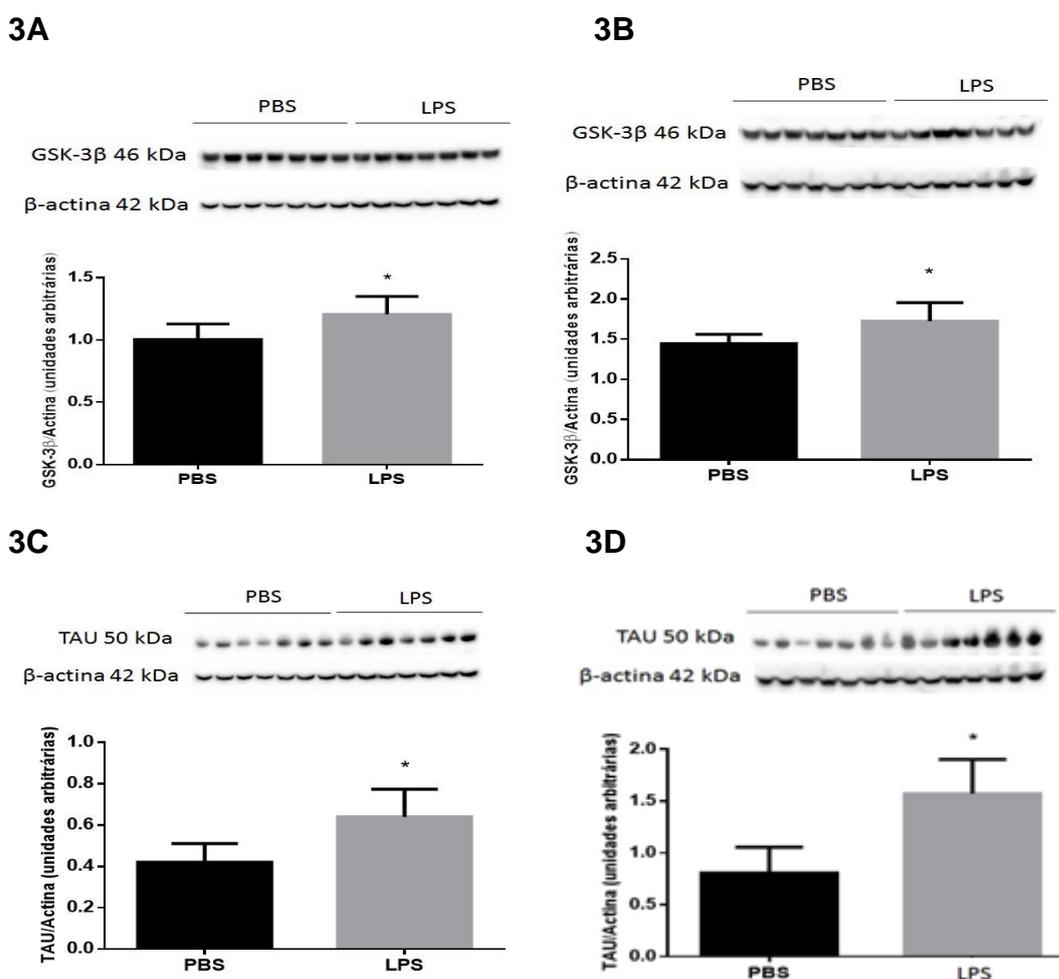


Figura 3. Expressão da proteína GSK-3 β no hipocampo (Figura 3A) e no córtex (Figura 3B) e da proteína Tau no hipocampo (Figura 3C) e córtex (Figura 3D) de animais 120 dias após a ativação imune neonatal. Os dados são expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$ vs. PBS. $n = 7-8$

Foi possível observar que houve um aumento estatisticamente significativo na expressão da proteína GSK-3 β no hipocampo (Figura 3A; $p = 0.0150$) e no córtex (Figura 3B; $p = 0.0396$) quando comparado ao grupo de animais que receberam PBS. Também houve um aumento significativo na expressão da proteína Tau no hipocampo

(Figura 3C; $p=0.0127$) e no córtex (Figura 3D; $p=0.0004$) em comparação ao grupo que recebeu PBS aos 2 dias de vida.

4.4 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNA GSK-3 β e TAU APÓS 180 DIAS DA ATIVAÇÃO IMUNE NEONATAL

A Figura 4 expressa os resultados da expressão das proteínas GSK-3 β no hipocampo (Figura 4A) e no córtex (Figura 4B) e Tau no hipocampo (Figura 4C) e córtex (Figura 4D) em animais expostos ao LPS ou PBS aos 2 dias e avaliados quando completaram 180 dias de vida.

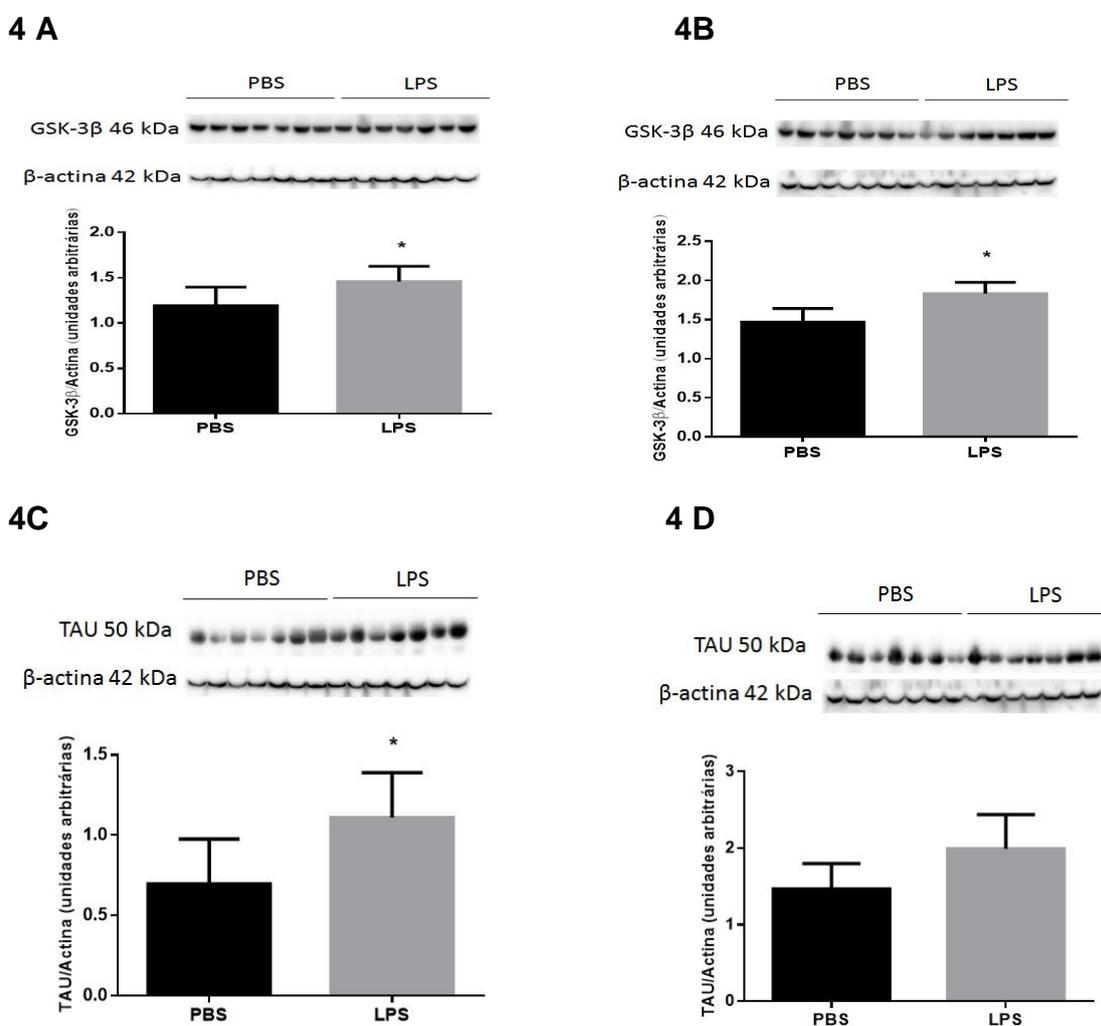


Figura 4. Expressão da proteína GSK-3 β no hipocampo (Figura 4A) e no córtex (Figura 4B) e da proteína Tau no hipocampo (Figura 4C) e córtex (Figura 4D) de animais 180 dias após a ativação imune neonatal. Os dados são expressos em média e desvio padrão. * $p<0.05$ vs. PBS. $n= 7-8$

Foi possível observar que houve um aumento estatisticamente significativo na expressão da proteína GSK-3 β em hipocampo (Figura 4A; $p=0,040$) e em córtex (Figura 4B; $p=0,0066$) dos animais expostos ao LPS quando comparado ao grupo de animais que receberam PBS. Quanto a proteína Tau, houve um aumento significativo na expressão em hipocampo (Figura 4C; $p=0,0171$). No entanto, no córtex (Figura 4D), não houve diferença significativa entre os grupos ($p= 0,0680$).

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que os animais expostos ao LPS no período neonatal e avaliados com 120 e 180 dias de vida apresentaram alteração na memória visuo-espacial. No que se refere a expressão proteica, houve um aumento da expressão de GSK-3 β no hipocampo quando os animais completaram 60 dias de vida. Nos animais com 120 dias de vida, houve um aumento da expressão de GSK-3 β e da Tau em hipocampo e córtex. Já nos animais com 180 dias, houve um aumento significativo na expressão da proteína GSK-3 β em hipocampo e córtex e da proteína Tau apenas em hipocampo.

As infecções causadas por bactérias gram-negativas são de alta prevalência durante os períodos pré-natal e neonatal. O LPS é o principal constituinte virulento da membrana externa das bactérias gram-negativas e, a exposição no período neonatal mimetiza, em parte, as alterações fisiológicas e comportamentais desencadeadas por uma infecção bacteriana gram-negativa⁹⁴. Embora a entrada de LPS no encéfalo após a administração sistêmica seja em quantidades pequenas, o aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios é capaz de aumentar a permeabilidade da BHE, alterar a microvasculatura endotelial e desencadear uma ativação microglial. Uma vez ativada, a microglia inicia um processo de neuroinflamação sustentada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias diretamente no tecido encefálico, intensificando os danos a células neuronais e gliais^{95–98}.

A microglia no período neonatal é responsável por um processo conhecido como poda sináptica, influenciando diretamente a sinaptogênese. Disfunções microgliais nos primeiros dias pós-natais estão associadas a hipoplasia cerebelar, perda e retração neuronal, atraso no processo de mielinização associado a alterações na proliferação e diferenciação das células progenitoras, aumento da expressão dos receptores TLR-4 e da mieloperoxidase de matriz 9 (MMP-9) e astrogliose em tecido encefálico poucos dias após a exposição ao LPS em um modelo animal⁹⁹. Recentemente, foi demonstrado que animais que receberam uma única injeção de LPS sistêmico no sétimo dia pós-natal, apresentaram um aumento de células apoptóticas em após 24 horas e um aumento dos níveis de IL-6, IL-1 β e TNF- α entre 6 e 48h em tecido encefálico. A ativação microglial foi observada após 48 horas da exposição ao LPS. Neste mesmo estudo, os autores mostraram que estas alterações

persistiram até 7 dias após a endotoxemia ⁹, reportaram que a ativação imune sistêmica por LPS no terceiro e no quinto dia pós-natal aumentou os níveis de TNF- α e IL-1 β em hipocampo de animais avaliados quando adultos.

A longo prazo, observou-se alterações cognitivas, principalmente no comportamento social e nos processos de aprendizado e memória quando os animais eram expostos ao LPS no período neonatal ^{100,101}. Um estudo realizado por Comim e colaboradores (2016) demonstrou que os animais expostos ao LPS no período neonatal apresentaram alterações na memória de habituação, de aversão e de reconhecimento de objetivos quando adultos (60 dias) ⁷. As alterações observadas a longo prazo no desenvolvimento encefálico após a ativação imune neonatal induzida por LPS resultam do fato de que a migração neuronal, a gliogênese e a mielinogênese ocorrerem em uma idade gestacional tardia e predominam nas primeiras duas semanas de vida pós-natal ⁹⁹. Além disso, foi demonstrado que uma única injeção sistêmica de LPS no décimo quarto dia pós-natal alterou o comportamento social quando os animais completaram 21 dias de vida ¹⁰².

Além das consequências comportamentais descritas acima, a exposição pré- e pós-natal ao LPS em roedores incluem ainda comportamentos semelhantes ao autismo induzidos pela exposição pré-natal no nono dia embrionário ¹⁰³ alterações semelhantes à esquizofrenia induzidas pela exposição LPS no décimo quinto dia embrionário¹⁰⁴ e comportamentos semelhantes a ansiedade induzidos pela exposição LPS no terceiro e quinto dia pós-natal ⁸. Entretanto, sobre as consequências a longo prazo relacionadas a neurodegeneração, há poucos relatos na literatura. Um estudo clínico realizado por Stoll e colaboradores (2004), observou a associação entre a sepse neonatal e déficits cognitivos. As crianças foram avaliadas entre 18 e 22 meses de idade e aquelas que apresentaram sepse neonatal, já apresentaram comprometimento cognitivo.

No presente estudo, foi possível observar que a endotoxemia no período neonatal alterou a memória visuo-espacial somente quando os animais completaram 120 e 180 dias de vida. Após 60 dias, quando os camundongos são considerados adultos jovens, não houve alteração da memória visuo-espacial. Esta memória consiste na capacidade de codificar, armazenar e recuperar informações sobre localizações espaciais. O hipocampo e o córtex são áreas envolvidas na formação e armazenamento da memória visuo-espacial. Déficits na memória visuo-espacial são

comumente observados em sujeitos com diagnóstico de doenças neurodegenerativas, como a DA.

A DA é caracterizada por uma perda progressiva das habilidades visuo-espaciais associado a um acúmulo de placas senis, emaranhados neurofibrilares e a uma perda neuronal principalmente em hipocampo e córtex temporal ^{12,13}. Além das alterações descritas acima, outra característica importante no processo degenerativo da DA é o aumento da expressão das proteínas GSK-3 β e Tau em tecido cerebral. Estudos demonstram que alterações na proteína GSK-3 β estão associados também a um aumento da produção e depósito da proteína A β . Neste estudo, foi observado, após a ativação imune neonatal, um aumento da expressão da proteína GSK-3 β em hipocampo de animais com 60, 120 e 180 dias de vida. Em córtex, a expressão de GSK-3 β aumentou somente em animais com 120 e 180 dias de vida. A alteração da memória visuo-espacial também foi observada somente em animais com 120 e 180 dias de vida. Neste contexto, uma importante revisão de literatura concluiu que o potencial de longa duração (LTP), essencial nos processos de aprendizado e memória, é influenciada pelo aumento da expressão de GSK-3 β ⁷⁸. Estudos mostram um aumento da expressão de GSK-3 β no hipocampo ¹⁶e no córtex-frontal ¹⁴ de indivíduos com diagnóstico de DA.

Uma das funções da proteína GSK-3 β é regular a fosforilação da proteína Tau. A Tau hiperfosforilada foi encontrada principalmente em hipocampo e zonas do lobo temporal durante o processo fisiopatológico da DA. O aumento da expressão de GSK-3 β , Tau e outros substratos podem estar envolvidos nos sintomas da DA, inclusive nos déficits cognitivos ¹⁰⁵. Alterações das proteínas GSK-3 β e Tau estão relacionados ao transporte axonal, levando ao comprometimento da memória e do aprendizado, como resultado da disfunção sináptica ^{78,80,105}. Camundongos transgênicos para a GSK-3 β apresentaram uma hiperfosforilação da proteína Tau e exibiram uma deficiência no reconhecimento visuo-espacial no teste do labirinto aquático de Morris ¹⁰⁶. Estudos *in vitro* e em modelos animais indicam que agentes patogênicos induzem a formação de A β , placas amiloides e ocasionam a hiperfosforilação da TAU ¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

Neste contexto, outro importante achado deste estudo foi o aumento da expressão da proteína Tau em hipocampo de camundongos com 120 e 180 dias de vida e em córtex somente em camundongos com 120 dias. Nas doenças neurodegenerativas, a proteína Tau apresenta-se na forma de filamentos anormais, insolúveis e hiperfosforilados. Ao estar anormalmente fosforilada é menos capaz de

polimerizar a tubulina e acaba por provocar uma ruptura do citoesqueleto celular, por consequência, a morte neuronal. Os emaranhados de degeneração neurofibrilares tendem a ser mais abundantes nas áreas onde a destruição neuronal é mais intensa, como na região do hipocampo e nas zonas do lóbulo temporal^{75,76}. A hiperfosforilação da proteína Tau é uma característica da patogênese da DA. Uma recente revisão de literatura mostrou que os emaranhados neurofibrilares contendo Tau altamente fosforilada se formam em paralelo com a manifestação das alterações cognitivas na DA. Entretanto, estes emaranhados não poderiam ser a única causa do comprometimento da memória e do processo neurodegenerativo¹¹¹. Utilizando animais transgênicos, Tracy e colaboradores (2016) mostraram que o aumento da expressão da Tau inibe a plasticidade sináptica subjacente as deficiências na memória dependente do hipocampo, como a memória visuo-espacial.

Neste sentido, após a explanação acima, o aumento da expressão das proteínas GSK-3 β e Tau em regiões altamente envolvidas no aprendizado e na memória poderiam estar associadas ao comprometimento das habilidades visuo-espaciais. Um achado consistente observado neste estudo foi que, nos animais com 60 dias, foi observado um aumento da expressão de GSK-3 β no hipocampo. Entretanto, estes animais não demonstraram alteração na memória visuo-espacial. A alteração na memória visuo-espacial apenas foi demonstrada nos animais com 120 dias, ou seja, quando houve um aumento da expressão das proteínas GSK-3 β e Tau, conjuntamente, tanto em hipocampo quanto em córtex. Já em 180 dias de vida, os animais expostos ao LPS no período neonatal, ainda apresentaram alteração na memória visuo-espacial associada a um aumento da expressão de GSK-3 β e Tau em hipocampo e apenas de GSK-3 β em córtex.

A hipótese inicial deste estudo é de que a ativação imune neonatal poderia estar associada a alterações na memória visuo-espacial e a um aumento da expressão das proteínas GSK-3 β e Tau a longo prazo em áreas que participam inicialmente dos processos fisiopatológicos envolvidos nos déficits cognitivos. Entretanto, optou-se por avaliar os animais a partir de 60 dias (adultos jovens), 120 dias (adultos) e 180 dias (idosos jovens) de vida para observar se estes achados estavam presentes em tempos precoces àqueles observados em modelos animais de neurodegeneração pois a DA é a patologia neurodegenerativa mais frequente associada à idade.

A DA também é reconhecida como uma doença inflamatória crônica, onde a neuroinflamação no SNC é o fator central ¹¹². As células da microglia ativadas foram encontradas em grande quantidade nos cérebros de indivíduos portadores da DA ¹⁷. A maioria dos estudos mostram a DA sendo associada a um processo neuroinflamatório em resposta ao depósito de peptídeo A β . Entretanto, poucos estudos mostram a neuroinflamação como um processo desencadeador da DA ou de alterações bioquímicas que podem estar associadas ao surgimento precoce de um processo neurodegenerativo associado a alterações comportamentais. Wang e colaboradores (2013) mostraram que a exposição neonatal ao LPS resultou em déficits cognitivos e redução no volume do hipocampo associados a respostas inflamatórias sustentadas no hipocampo em animais com 71 dias de vida ¹¹³. Também foram observados um aumento do número de microglias ativadas e um aumento dos níveis de IL-1 β no hipocampo. Este estudo revelou que a exposição neonatal ao LPS e a neuroinflamação ocasionada causaram lesões persistentes no hipocampo e resultaram em um comprometimento da memória a longo prazo.

A etiologia da DA não se baseia em mutações relacionadas com a produção de A β ou a hiperfosforilação da proteína tau, que atualmente são a base de modelos *in vivo* da DA. Recentemente, tem-se evidenciado que mecanismos como a neuroinflamação crônica podem ocorrer antes das alterações patológicas clássicas citadas acima. Este mesmo autor relata que um modelo baseado na hipótese da neuroinflamação como fator etiológico na DA deve incluir um processo neuroinflamatório crônica primário, um comprometimento cognitivo e o envolvimento tardio da proteína Tau e do peptídeo A β . Estudos propõem a combinação entre a neuroinflamação crônica e o envelhecimento patológico. Esta junção poderia desempenhar um papel importante no mecanismo das doenças neurodegenerativas, incluindo a DA ¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Recentemente, Gasparotto e colaboradores (2018) demonstraram que animais adultos submetidos a sepse por ligação e perfuração cecal (CLP) apresentaram um aumento da expressão do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), TLR-4, proteína glial fibrilar ácida (GFAP), óxido nítrico sintase neuronal e da expressão das proteínas A β e Tau em hipocampo e córtex após 1, 15 e 30 dias da indução ¹¹⁷. Em um segundo momento, os autores injetaram um anticorpo para RAGE diretamente no hipocampo após 15, 17 e 19 dias da indução e verificaram que houve uma diminuição da expressão de Tau e A β .

Neste contexto, acredita-se que os resultados deste estudo possam contribuir para fortalecer as evidências de que um processo de ativação imune neonatal sistêmica possa ocasionar uma alteração na memória visuo-espacial e aumentar a expressão das proteínas GSK-3 β e Tau em hipocampo e córtex em períodos mais tardios. Após os achados descritos ao longo desta dissertação, acredita-se que a ativação imune neonatal sistêmica possa causar um processo de neuroinflamação e uma ativação microglial. Uma vez ativada, a microglia pode aumentar a liberação de citocinas pró-inflamatórias e agentes neurotóxicos que teriam a capacidade de alterar a neurogênese e a plasticidade sináptica durante o desenvolvimento encefálico. Além disso, a ativação microglial precoce e crônica poderia levar a um processo neuroinflamatório persistente. Estas alterações poderiam explicar, em parte, o aumento da expressão das proteínas GSK-3 β e Tau além do comprometimento da memória visuo-espacial observados neste estudo. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados a fim de relacionar mais diretamente como um processo neuroinflamatório neonatal poderia modificar a funcionalidade destas proteínas bem como ocasionar as alterações cognitivas.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se com o presente estudo que os animais expostos a endotoxemia no período neonatal, quando avaliados aos 60, 120 e 180 dias de vida, demonstrando, alteração na memória visuo-espacial aos 120 e 180 dias. No que se refere a expressão proteica, houve um aumento da expressão de GSK-3 β no hipocampo quando os animais completaram 60 dias de vida. Nos animais com 120 dias de vida, houve um aumento da expressão de GSK-3 β e da Tau no hipocampo e córtex. Já nos animais com 180 dias, houve um aumento significativo na expressão da proteína GSK-3 β no hipocampo e córtex e da proteína Tau apenas em hipocampo.

Os resultados encontrados poderão contribuir para fortalecer as evidências de que um processo de ativação imune neonatal sistêmica possa estar associado a um processo de neuroinflamação persistente e este, desencadear um evento neurodegenerativo ao longo do curso de vida. A neurodegeneração uma vez iniciada, poderá propiciar alterações na memória visuo-espacial e aumentar a expressão das proteínas GSK-3 β e Tau em hipocampo e córtex em períodos mais tardios.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Estudos adicionais devem ser realizados a fim de relacionar mais diretamente o processo neuroinflamatório neonatal e o processo de degeneração ao longo do curso de vida. Deve-se também elucidar o papel da proteína A β nas estruturas analisadas para verificar se as alterações encontradas neste estudo possam interferir do depósito precoce de A β .

REFERÊNCIAS

1. Ferreira RC, Mello RR, Silva KS. Neonatal sepsis as a risk factor for neurodevelopmental changes in preterm infants with very low birth weight. *Jornal Pediatric.Rio de Janeiro*. 2014. 90(3):293–299.
2. Santos APS, Silva MLC, Souza NL, Mota GM, FRança DF. Nursing diagnoses of newborns with sepsis in a Neonatal Intensive Care Unit.*Rev. Latino-Am Engermagem*. 2014. 22(2):255–61.
3. Cortese F, Scicchitano P, Gesualdo M, Filaninno A, Giorgi E, Schettini F, et al. Early and Late Infections in Newborns: Where Do We Stand? A Review. *Pediatric and Neonatology*. 2016. 57(4):265–273.
4. Machado JR, Soave DF, Silva MV, Menzes LB, Etchebehere RM, Monteiro MLGR, et al. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. *Mediators Inflamm*. 2014.
5. Silveira RC, Giacomini C, Procianoy RS. Neonatal sepsis and septic shock: concepts update and review. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2010.22(3):280–290.
6. Nazem A, Sankowski R, Bacher M, Al-Abed Y. Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer’s disease. *Journal of Neuroinflammation*. 2015. 12:74.
7. Comim CM, Bussmann RM, Simão SR, Ventura L, Freiburger V, Patricio JJ, et al. Experimental Neonatal Sepsis Causes Long-Term Cognitive Impairment. *Mol Neurobiol*. 2015.
8. Falck M, Osredkar D, Wood TR, Maes E. Flatebol T, Sabir H, et al. Neonatal Systemic Inflammation Induces Inflammatory Reactions and Brain Apoptosis in a Pathogen-Specific Manner. *Neonatology*. 2018. 113(3):212–220.
9. Milbrandt EB, Angus DC. Bench-to-bedside review: Critical illness-associated cognitive dysfunction – mechanisms, markers, and emerging therapeutics. *Crit care*. 2006. 10:238.
10. Izquierdo I. Memória. Porto Alegre: Editora Artmed. 2011.
11. Möller HJ, Graeber MB. The case described by Alois Alzheimer in 1911. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1998. 248(3):111–122.
12. Goedert M, Spillantini MG. A Century of Alzheimer’s Disease. *Science*. 2006;314(5800):777–781.

13. Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP. Increased level of active GSK-3 b in Alzheimer ' s disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2007:43–55.
14. Paula VJR, Guimarães FM, Diniz BS, Forlenza OV. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease Amyloid-beta, TAU protein or both?. *Dement Neuropsychol*. 2009;3(3):188–194.
15. Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW. Incipient Alzheimer's disease: Microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(7):2173–2178.
16. Brown GC, Bal-Price A. Inflammatory Neurodegeneration Mediated by Nitric Oxide, Glutamate, and Mitochondria. *Mol Neurobiol*. 2003. 27(3):325–355.
17. Du Pont-Thibodeau G, Joyal J-S, Lacroix J. Management of neonatal sepsis in term newborns. *F1000Prime Rep*. 2014. 6:67.
18. 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. 101(6):1644-55.
19. Global Health Observatory. world Heal Organ. 2015. Available at: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.ghe1002015-BRA?lang=en>. Accessed January 1, 2016.
20. Miura E, Silveira RC, Procianoy RS. Sepsis neonatal: diagnóstico e tratamento. *Jornal de Pediatria*. Rio de Janeiro.1999. 75 : 57-62.
21. Oliveira COP, Souza JRS, Machado RC, Feijão AR, Souza NL. Fatores de risco para sepsis neonatal em unidade de terapia: Estudo de evidência. *Cogitare Enfermagem*. 2016. 21(2): 01-09.
22. Dal-Bó K, Silva RM, Sakae TM. Infecção hospitalar em uma unidade de terapia intensiva neonatal do Sul do Brasil. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2012. 24(4):381–385.
23. Silveira RC, Procianoy RS. Uma revisão atual sobre sepsis neonatal. *Bol Científico Pediatr*. 2012. 1:29–35.
24. Goulart AP, Valle CF, Dal-Pizzol F, Cancelier ACL. Fatores de Risco para o

- Desenvolvimento de Sepse Neonatal Precoce em Hospital da Rede Pública do Brasil. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2006. 18(2).
25. Seale AC, Obiero CW, Berkley JA. Rational development of guidelines for management of neonatal sepsis in developing countries. *Current Opinion Infectious Diseases*. 2015. 28(3):225–30.
 26. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol*. 2007.7(3):379–90.
 27. Meadow W, Rudinsky B. Inflammatory mediators and neonatal sepsis. Rarely has so little been known by so many about so much. *Clin Perinatol*. 1995. 22(2):519–36.
 28. Meng F, Lowell CA. Lipopolysaccharide (LPS)-induced Macrophage Activation and Signal Transduction in the Absence of Src-Family Kinases Hck, Fgr, and Lyn. *Journal Of Experimental Medicine*. 1997. 185(9):1661–1670.
 29. Dammann O, O 'shea M. Cytokines and Perinatal Brain Damage. *Clin Perinatol*. 2008. 35(4): 643
 30. Favrais G, van de Looji Y, Fleiss B, Ramanantsoa N, Bonnin P, Stoltenburg-Didinger G, et al. Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *American Neurological Association*. 2011.70(4):550-65
 31. Alshaikh B, Yusuf K, Sauve R. Neurodevelopmental outcomes of very low birth weight infants with neonatal sepsis: systematic review and meta-analysis. *J Perinatol*. 2013. 33(7): 558-64.
 32. Kuypers E, Ophelders D, Jellena RK, Kunzmanns S, Gavilanes AW, Kramer BW. White matter injury following fetal inflammatory response syndrome induced by chorioamnionitis and fetal sepsis: lessons from experimental ovine models. *Early Hum DEv*. 2012. 88(12): 931-6.
 33. Basu S, Agarwal P, Anupurba S, Shuklar R, Kumar A. Elevated plasma and cerebrospinal fluid interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha concentration and combined outcome of death or abnormal neuroimaging in preterm neonates with early-onset clinical sepsis. *J Perinatol*. 2015. 35(10):855-61.
 34. Xie D, Shen F, He S, Chen M, Han Q, Fang M, et al. IL-1 β induces hypomyelination in the periventricular white matter through inhibition of oligodendrocyte progenitor cell maturation via FYN/MEK/ERK signaling pathway in septic neonatal rats. *Glia*.2016.64(4):588-602.

35. Manning SM, Talos DM, Zhou C, Selip DB, Park HK, Volpe JJ, et al. NMDA receptor blockade with memantine attenuates white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia. *J Neurosci*. 2008. 28 (26):6670-8.
36. Czirr E, Wyss-Coray T. The immunology of neurodegeneration. *J Clin Invest*. 2012.122(4):1156-63.
37. Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *ScienceDirect*. 2007. 28(1):5-11.
38. Galea I, Bechmann I, Perry VH . What is immune privilege (not)? *Trends Immunol*. 2007. 28(1):12-8.
39. Strunk T, Inder T, Wang X, Burgner D, Mallard C, Levy O. Infection-induced Inflammation and Cerebral Injury in Preterm Infants. *Lancet Infect Dis*. 2014. 14(8):751–762.
40. Chen WW, Zhang X, Huang WJ. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep*. 2016. 13(4):3391–6.
41. Hagberg H, Mallard C, Ferriero DM, Vannucci SJ, Levison SW, Vexler ZS, et al. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Ver Neurol*. 2015. 11(4):192-208.
42. Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*. 2010. 129(2):154-69.
43. Doorn KJ, Lucassen PJ, Boddeke HW, Prins M, Berendse HW, Drukarch B, et al. Emerging roles of microglial activation and non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2012. 98(2):222-38.
44. Hurley LL, Tizabi Y. Neuroinflammation, neurodegeneration, and depression. *Neurotox Res*. 2013. 23(2):131-44.
45. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem*. 2004. 89(5):1092-100.
46. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. *J Neurosci*. 2004. 24(9):2143–55.
47. Monje ML, Toda H, Palmar TD. Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science*. 2003. 302(5651):1760–1765.
48. Dammann O, Leviton A. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res*. 1997. 42(1):1–8.

49. Falcão AS, Silva RFM, Vaz AR, Gomes C, Fernandes A, Barateiro A, et al. Cross-talk between neurons and astrocytes in response to bilirubin: adverse secondary impacts. *Neurotox Res.* 2014;26(1):1–15.
50. Falção AS, Fernandes A, Brito MA, Silva RF, Brites D. Bilirubin-induced inflammatory response, glutamate release and cell death in rat cortical astrocytes are enhanced in younger cells. *Neurobiol Dis.* 2005. 20 (2): 199-206.
51. Lamar CD, Hurley RA, Taber KH. Sepsis-associated encephalopathy: review of the neuropsychiatric manifestations and cognitive outcome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2011. 23(3): 237-41.
52. Granja C, Dias C, Costa-Pereira A, Sarmiento A. Quality of life of survivors from severe sepsis and septic shock may be similar to that of others who survive critical illness. *Crit Care.* 2004.
53. Gemma C. Neuroimmunomodulation and Aging. *Aging Dis.* 2010.1(3):169–172.
54. Williamson R, Scales T, Clark BR, Gibb G, Reynolds CH, Lellie S, et al. Rapid Tyrosine Phosphorylation of Neuronal Proteins Including Tau and Focal Adhesion Kinase in Response to Amyloid- β Peptide Exposure: Involvement of Src Family Protein Kinases. *J Neurosci.* 2002. 22(1):10-20.
55. Adams-Chapman I, Stoll BJ. Neonatal infection and long-term neurodevelopmental outcome in the preterm infant. *Curr Opin Infect Dis.* 2006. 19(3):290–7.
56. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, et al. Neurodevelopmental and Growth Impairment Among Extremely Low-Birth-Weight Infants With Neonatal Infection. *JAMA.* 2004. 292(19):2357–65.
57. Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron.* 1991. 6(4):487–498.
58. Dalgalarondo P. *Psicopatologia e semiologia dos Transtornos mentais.* Porto Alegre. Artemed. 2008.
59. Fuentes, D. Malloy-Diniz, L.F. Camargo, C.H.P. Consenza RM. *Neuropsicologia - Teoria e Prática.* Porto Alegre: Artemed. 2014.
60. Mourão CAJr, Faria NC. Memória. *Psychology/ Reflexão e Crítica.* 2015. 28(4):780–788.
61. Davidoff LL. *Introdução à Psicologia.* São Paulo: Pearson Makron Books.

- 2001.
62. Mourão CA Jr., Melo LBR. Integração de três conceitos: Função executiva, memória de trabalho e aprendizado. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*. 2011. 27(3), 309-314.
 63. Sousa AB, Salgado TDM. Memória, aprendizagem, emoções e inteligência. *Rev Lib*. 2015. 16:101–220.
 64. Sá CSC, Medalha CC. Aprendizagem e Memória – Contexto Motor. *Rev Neurociências*. 2001. 9(3):103–110.
 65. Carlson NR. *Fisiologia do Comportamento*. 7 ed. Barueri. Manole. 2002.
 66. Whitlock JR, Sutherland RJ, Witter MP, Moser MB, Moser EL. Navigating from hippocampus to parietal cortex. *Proc Natl Acad Sci*. 2008. 105 (39): 14755-62.
 67. Torrealba F, Valdés JL. The parietal association cortex of the rat. *Biol Res*. 2008. 41(4):369-77.
 68. Anderson JR. *Aprendizagem e memória: uma abordagem integrada*. 2ed. Rio de Janeiro. LTC. 2005.
 69. Squire LR, Zola-Morgan JT. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci*. 2011. 34:259-88.
 70. Caramella P, Barbosa MT. Como diagnosticar as quatro causas mais frequentes de demência? *Rev Bras Psiquiatr*. 2002. 24:7–10.
 71. Majd S, Power JH, Grantham HJM. Neuronal response in Alzheimer's and Parkinson's disease: the effect of toxic proteins on intracellular pathways. *BMC Neurosci*. 2015.16:69.
 72. Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 2004. 44(1):181–193.
 73. Korycyn AD. The amyloid cascade hypothesis. *Alzheimers Dement*. 2008. 4(3):176-8.
 74. Kikkawa M, Ishikawa T, Nakat T, Wakabayashi T, Hirokawa N. Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. *J Cell Biol*. 1994. 127:1965-71.
 75. Vickers JC, Dickson TC, Adlard PA, Saunders HL, King CE, McCormack G. The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2000. 60(2): 139-65.
 76. Hoer C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease.

- J Neurochem. 2008. 104(6):1433– 9.
77. Hooper C, Markevich V, Plattner F, Killick R, Schofield E, Engel T, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur J Neurosci*. 2007. 25(1):81–6.
 78. Goold RG, Gordon-Weeks PR. Microtubule-associated protein 1B phosphorylation by glycogen synthase kinase 3 β is induced during PC12 cell differentiation. *J Cell Sci*. 2001.114:4273-84.
 79. Turenne GA, Price BD. Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC Cell Biol*. 2001. 2:12.
 80. Galera C, Garcia RB, Vasques R. Componentes funcionais da memória visuoespacial. *Estud Avançados*. 2013. 27(77):29–43.
 81. Lorntz B, Soares AM, Moore SR, Pinkerton R, Gansneder B, Bovbjerg VE, et al. Early childhood diarrhoea predicts impaired school performance. *Pediatr Infect Dis J*. 2006. 25(6):513–520.
 82. Dal-Pizzol F, Ritter C, Cassol OJ Jr, Rezin GT, Petronilho F, Zugno AI, et al. Oxidative Mechanisms of Brain Dysfunction During Sepsis. *Neurochem Res*. 2010. 35(1):1-12.
 83. Taccone FS, Su F, Pierrakos C, He X, James S, Dewitte O, et al. Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study. *Crit Care*. 2010.14(4):R140.
 84. Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, et al. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol*. 2007. 204(2):733–40.
 85. Mawanda F, Wallace R. Can infections cause Alzheimer's disease?. *Epidemiol Rev*. 2013. 35(1):161–180.
 86. Vuaden C, Bonan CD (orientadora). Influência da Endotoxemia e da ativação dos receptores A2A de adenosina sobre a hidrólise de nucleotídeos extracelulares. Porto Alegre. 2010.
 87. Boca SM, Nishida M, Harris M, Rao S, Cheema AK, Gill K, et al. Discovery of Metabolic Biomarkers for Duchenne Muscular Dystrophy within a Natural History Study. *PLoS One*. 2016. 11(4):e0153461.
 88. Zhang G, Ghosh S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin*

- Res. 2000. 6(6):453-7.
89. Trent MS, Stead CM, Tran AX, Hankins J V. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J Endotoxin Res.* 2006.12(4):205–23.
 90. Sankowski R, Mader S, Valdés-Ferrer SI. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. *Front Cell Neurosci.* 2015. 2:9-28.
 91. Singh K, Zhang LX, Bendelja K, Heath R, Murphy S, Sharma S, et al. Inter-alpha inhibitor protein administration improves survival from neonatal sepsis in mice. *Pediatr Res.* 2010. 68 (3):242–7.
 92. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 1982. 24;297: 681-3.
 93. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 2001. 7(3):167–202.
 94. Jeong HK, Jou I, Joe EH. Systemic LPS administration induces brain inflammation but not dopaminergic neuronal death in the substantia nigra. *Exp Mol Med.* 2010. 42(12):823–832.
 95. Banks WA, Erickson MA. The blood–brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis.* 2010. 37(1):26–32.
 96. Grab DJ, Chakravorty SJ, van der Heyde H, Stins MF. How can microbial interactions with the blood-brain barrier modulate astroglial and neuronal function?. *Cell Microbiol.* 2011. 13(10):1470–8.
 97. Bodea LG, Wang Y, Linnartz-Gerlach B, Kopatz J, Sinkkonen L, Musgrove R, et al. Neurodegeneration by Activation of the Microglial Complement–Phagosome Pathway. *J Neurosci.* 2014. 18;34(25):8546-56.
 98. Cardoso FL, Herz J, Fernandes A, Rocha J, Sepodes B, Brito MA, et al. Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. *J Neuroinflammation.* 2015. 29;12:82.
 99. Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci.* 2014. 17(3):400–6.
 100. Santos LE, Beckman D, Ferreira ST. Microglial dysfunction connects depression and Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun.* 2016. 55:151–165.
 101. Doenni VM, Gray JM, Song CM, Patel S, Hill MN, Pittman QJ. Deficient Adolescent Social Behavior Following Early-Life Inflammation is Ameliorated by

- Augmentation of Anandamide Signaling. *Brain Behav Immun*. 2016. 58:237–247.
102. Kirsten TB, Lippi LL, Bevilacqua E, Bernardi MM. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1B levels in adult rat offspring: Relevance to Autism. *PLoS One*. 2013. 8(12):e82244.
 103. Wischhof L, Irrsack E, Osorio C, Koch M. Prenatal LPS-exposure --a neurodevelopmental rat model of schizophrenia – differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015. 57:17–30.
 104. Walker AK, Nakamura T, Hodgson DM. Neonatal lipopolysaccharide exposure alters central cytokine responses to stress in adulthood in Wistar rats. *Stress*. 2010. 13(6):506–15.
 105. Takashima A. GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2006. 9(3 Suppl):309–17.
 106. Hernández F, Borrell J, Guaza C, Avila J, Lucas JJ. Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 β in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem*. 2002. 83(6):1529–1533.
 107. Wozniak MA, Itzhaki RF, Shipley SJ, Dobson CB. Herpes simplex virus infection causes cellular β -amyloid accumulation and secretase upregulation. *Neurosci Lett*. 2007. 18; 429(2-3):95–100.
 108. Little CS, Hammond CJ, MacIntyre A, Balin BJ, Appelt DM. Chlamydia pneumoniae induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice. *Neurobiol Aging*. 2004. 25(4):419–29.
 109. Miklossy J, Kis A, Radenovic A, Miller L, Forro L, Martins R, et al. Beta-amyloid deposition and Alzheimer's type changes induced by Borrelia spirochetes. *Neurobiol Aging*. 2006. 27(2):228–36.
 110. Harris SA, Harris EA. Herpes Simplex Virus Type 1 and Other Pathogens are Key Causative Factors in Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2015. 48(2):319–353.

111. Tracy TE, Gan L. Acetylated tau in Alzheimer's disease: An instigator of synaptic dysfunction underlying memory loss. Increased levels of acetylated tau blocks the postsynaptic signaling required for plasticity and promotes memory deficits associated with tauopathy. *BioEssays*. 2017. 39(4).
112. Bagyinszky E, Giau VV, Shim K, Suk K, An SSA, Kim S. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *J Neurol Sci*. 2017. 376:242–254.
113. Wang KC, Fan LW, Kaizaki A, Pang Y, Cai Z, Tien LT. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. *Neuroscience*. 2013. 27. 234:146–157.
114. Pizza V, Agresta A, D'Acunto CW, Festa M, Capasso A. Neuroinflamm-aging and neurodegenerative diseases: an overview. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011. 10(5):621–34.
115. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*. 2007. 128(1):92–105.
116. Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?. *Nat Med*. 2006;12(9):1005–15.
117. Gasparotto J, Girardi CS, Somensi N, Ribeiro CT¹, Moreira JCF¹, Michels M, et al. Receptor for advanced glycation end products mediates sepsis-triggered amyloid- β accumulation, Tau phosphorylation, and cognitive impairment. *J Biol Chem*. 2018. 293(1):226–244.

ANEXO**ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética**



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

Palhoça, 21 de março de 2017
Registro na CEUA (código):17.003.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Clarissa Martinelli Comim Cassol

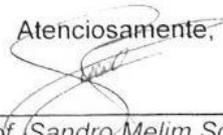
Prezado(a),

Viemos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação da memória espacial e expressão das proteínas TAU, GSK-3 e B-Amiloide em tecido cerebral em animais de diferentes idades expostos a endotoxemia no período neonatal", registrada com o nº17.003.4.01.IV, sob a responsabilidade de Clarissa Martinelli Comim Cassol - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 11/04/2017.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção 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 informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,



Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão