



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SANDRA REGINA SANTANA AGUIAR BONFANTE

**PARTICIPAÇÃO DA STANIOCALCINA-1 NA PROTEÇÃO CONTRA O ESTRESSE
OXIDATIVO HIPOCAMPAL E PREJUÍZO A MEMÓRIA EM MODELO ANIMAL DE
SEPSE**

SANDRA REGINA SANTANA AGUIAR BONFANTE

**PARTICIPAÇÃO DA STANIOCALCINA-1 NA PROTEÇÃO CONTRA O ESTRESSE
OXIDATIVO HIPOCAMPAL E PREJUÍZO A MEMÓRIA EM MODELO ANIMAL DE
SEPSE**

LINHA DE PESQUISA: Neurociências

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

Orientadora: Profa. Fabricia Petronilho, Dra.

Tubarão

2018

B69 Bonfante, Sandra Regina Santana Aguiar, 1988-
Participação da Stanioalcina-1 na proteção contra o estresse oxidativo hipocampal e prejuízo à memória em modelo animal de sepse / Sandra Regina Santana Aguiar Bonfante ; -- 2018.
75 f. : il. color. ; 30 cm

Orientadora : Profa. Dra. Fabricia Petronilho.
Dissertação (mestrado)–Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2018.
Inclui bibliografias.

1. Hormônios glicoproteicos. 2. Septicemia. 3. Hipocampo (Cérebro). 4. Estresse oxidativo. 5. Memória. I. Petronilho, Fabricia. II. Universidade do Sul de Santa Catarina – Mestrado em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 614.577

Ficha catalográfica elaborada por Francielli Lourenço CRB 14/1435

SANDRA REGINA SANTANA AGUIAR BONFANTE

**PARTICIPAÇÃO DA STANIOCALCINA-1 NA PROTEÇÃO CONTRA O ESTRESSE
OXIDATIVO HIPOCAMPAL E PREJUÍZO A MEMÓRIA EM MODELO ANIMAL DE
SEPSE**

Esta Dissertação foi julgada adequada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Mestrado, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Tubarão (SC), 31 de julho de 2018.

Orientador: Profa Fabricia Petronilho, Dra.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Profa. Josiane Somariva Prophiro, Dra.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Profa. Talita Tuon, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Participação da Staniocalcina-1 na proteção contra o estresse oxidativo hipocampal e prejuízo a memória em modelo animal de sepse

SANDRA REGINA SANTANA DE AGUIAR BONFANTE

AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 31 de julho de 2018.

Doutora Fabricia Cardoso Petronilho (orientador)

Doutora Talita Tuon (Avaliador externo - UFSC)

Doutora Josiane Somariva Prophiro (avaliador interno)

Professor Doutor Jefferson Traebert

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

Dedico esse trabalho a minha mãe, meu esposo, meus irmãos, amigos, professores e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esse projeto se realizasse.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar cursar o mestrado e por tantas coisas boas que me concedeu nessa maravilhosa caminhada. Que apesar das dificuldades foi tudo gratificante e de muito aprendizado. “Coisas boas nos acontecem quando a gente acredita, quando a gente tem fé, quando a gente coloca Deus a frente da nossa vida. Dificuldades todos nós temos, a diferença é que uns assumem, outros disfarçam, uns desistem de lutar e outros lutam por ainda acreditar” (Cecília Sfalsin).

Aos meus pais, a quem eu devo muito e nunca poderei pagar o amor que me deram, a tudo que me ensinaram e ensinam até hoje. Em especial a minha mãe Madalena da Silva Santana, que me apoiou em todos os momentos e não mediu esforços para que eu conquistasse esse sonho. Meus irmãos me apoiaram e me incentivaram a não desistir.

Ao meu esposo Tiago Coelho Bonfante, que sempre esteve ao meu lado, principalmente nas horas mais difíceis. O carinho e a paciência que teve pelos dias em que estive ausente e pelos finais de semanas estudando. E que não media esforços para me ajudar e entender permanecendo firme até o fim.

Agradecer ricamente a minha orientadora Dra. Fabricia Petronilho, uma pessoa com um conhecimento e caráter inigualável. Coração de ouro, puro e humildade única em uma só pessoa. Obrigada do fundo do meu coração, por toda paciência e orientação, carinho e ajuda que um verdadeiro mestre poderia me oferecer.

Meus sinceros agradecimentos à Coordenação de Pessoal de Nível Superior – CAPES, por viabilizar a realização desta dissertação através da concessão da bolsa de estudos pelo Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Comunitárias (PROSUC).

Aos meus colegas de laboratório sem exceção de nenhum, pois todos tiveram uma enorme importância e que me deram um grande apoio e ajuda para que isso fosse possível.

E com enorme gratidão, eu não poderia deixar de mencionar a minha prima e amiga Driélly Silva Florentino, que desde o início me apoiou e me mostrou o caminho. Ela foi muito importante para mim nessa grande conquista.

“Deus não escolhe os capacitados capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança”. (Albert Einstein)

RESUMO

Introdução: A sepse continua sendo a principal causa de morte em UTIs, apresentando alta taxa de incidência, com custos elevados. Durante a sepse, o sistema nervoso central (SNC) é um dos primeiros órgãos a serem afetados, e isto se manifesta como encefalopatia associada à sepse (EAS). **Objetivo:** Verificar o efeito da Stanniocalcina-1 sobre os parâmetros de estresse oxidativo hipocampal e o dano à memória em animais submetidos à sepse por ligação e perfuração cecal (CLP). **Métodos:** Ratos Wistar machos (250-350g) foram submetidos ao modelo de sepse por CLP, com animais sham como controle. A primeira parte experimental foi dividida em sham + salina, CLP + salina e CLP + rhSTC-1 (20, 50 e 100 ng/kg por via intracerebroventricular). A segunda parte foi realizada para avaliação comportamental por meio de teste de esQUIVA inibitória 10 dias após CLP. Os animais foram divididos em sham + salina, sham + rhSTC-1 100ng/kg, CLP + salina e CLP + rhSTC-1 100ng/kg. Foram utilizados um nº de 12 por grupo salina e n de 18 por grupo CLP para comportamento. O hipocampo foi removido 24h após a cirurgia por CLP. No hipocampo, foram avaliados os níveis de nitrito e nitrato (N/N), dano oxidativo em lipídios (TBARS), proteínas carboniladas, e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Além disso, 10 dias após a indução de sepse, foram avaliada a memória e aprendizagem dos animais. **Resultados:** Foi verificado um aumento na concentração de N/N no grupo CLP com diminuição nas três doses de STC-1. Para o dano em lipídios, não encontramos resultados significativos, entretanto para o dano em proteína carboniladas, verificamos um aumento em CLP com diminuição na dose de 100ng/kg de STC-1. Na atividade das enzimas antioxidantes, houve diminuição dos seus níveis no grupo CLP e não houve alteração com tratamento para CAT, no entanto que para SOD, aumentou a sua atividade na dose de 100ng/kg de STC-1. No teste de memória por esQUIVA inibitória, houve menor latência no grupo CLP sem tratamento com aumento entre treino e teste para STC-1 100ng/kg. **Conclusão:** A STC-1 atenua o estresse oxidativo hipocampal de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e influencia na melhora da memória 10 dias após a indução de sepse.

Descritores: Stanniocalcina-1. Sepse. Hipocampo. Estresse oxidativo. Memória.

ABSTRACT

Introduction: Sepsis still being the main cause of death in ICUs, having a high level of incidence, with elevated costs. During sepsis, the central nervous system (CNS) is one of the first organs to be affected, and this is manifested as sepsis associated encephalopathy (SAE). **Objective:** This work was aimed to observe the effect of Stanniocalcina-1 over the parameters of oxidative stress in the hippocampus and the memory damage in animals submitted to sepsis by cecal ligation and puncture (CLP). **Methods:** Male Wistar rats (250-350g) were submitted to the model of sepsis by CLP, with sham animals as a control. The first experimental part divided into sham + saline, CLP + saline and CLP + rhSTC-1 (20, 50 and 100 ng/kg by intracerebroventricular injection. The second experimental part was realized for behavioral evaluation by means of inhibitory avoidance test 10 days after CLP. The animals were divided into sham + saline, sham + rhSTC-1 100ng/kg, CLP + saline and CLP + rhSTC-1 100ng/kg. An N of 12 was used per saline group and an N of 18 was used per CLP group for behavior. The hippocampus was removed 24 hours after surgery. In the hippocampus were evaluated the nitrite and nitrate levels (N/N), oxidative damage to lipids (TBARS), protein carbonylation, and activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes. Also, 10 days after sepsis induction, memory and learning of the animals were evaluated.

Results: It was verified an increased concentration of N/N in the CLP group with the decrease in the three doses of STC-1. For the lipids damage, we did not find significant results to the treatments, while for the damage to carbonylated proteins, we verified an increase of CLP with the decrease of the dose of 100ng/kg of STC-1. The CAT activity decreased in the CLP group and there was not any change with this treatment while SOD increased its activity in the dose of 100ng/kg of STC-1. In the test de memory by inhibitory avoidance, there was smaller latency in CLP group without treatment with the increase between train and test to STC-1 100ng/kg. **Conclusion:** The STC-1 attenuates the oxidative stress in the hippocampus of rats submitted to polymicrobial sepsis and influences memory improvement 10 days after sepsis induction.

Keywords: Stanniocalcina-1. Sepsis. Hippocampus. Oxidative stress. Memory.

LISTAS

Lista de abreviaturas

BHE – Barreira Hematoencefálica

Ca⁺ – Cálcio

CAT – Catalase

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CLP – Ligação e Perfuração Cecal (*Cecal Ligation and Puncture*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)

EAS – Encefalopatia Associada à Seps

ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

GPx – Glutathione peroxidase

ILAS – Instituto Latino Americano de Seps

IL-1 β – Interleucina - 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

LPS - Lipopolissacarídeo

MPO – Mieloperoxidase

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NF-KB – Fator Nuclear kappa B (Nuclear Factor kappa B)

NO - Óxido nítrico (do inglês, nitric oxid)

PAMPs – Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (Pathogen-associated molecular patterns)

quickSOFA – Avaliação Sequencial de Falência de Órgãos (quick Sequential Organ Failure Assessment)

RRP - Receptores de reconhecimento de padrão

SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (Systemic Inflammatory Response Syndrome)

SNC – Sistema Nervoso Central

STC-1 – Stanniocalcina-1

SOD – Superóxido Dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

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

TRL – Receptor Toll-like

TRL-4 – Receptor Toll-like 4

UCPs – Proteínas Mitocondriais de Desacoplamento (Mitochondrial Decoupling Proteins)

UTIs – Unidades de Terapia Intensiva

Lista de tabelas

Tabela 1 – Definições sobre sepse e condições relacionadas, criado em 1991....16

Lista de figuras

Figura 1 - Fluxograma do desenho experimental 1.....	32
Figura 2 - Fluxograma do desenho experimental 2.....	32
Figura 3 - Concentração de nitrito e nitrato no hipocampo em ratos que receberam STC-1 ou salina e submetidos à sepse polimicrobiana por CLP.....	37
Figura 4 - Avaliação do dano em lipídio no hipocampo em ratos que receberam STC-1 ou salina e submetidos à sepse polimicrobiana por CLP.....	38
Figura 5 - Avaliação do nível de proteínas carboniladas no hipocampo em ratos que receberam STC-1 ou salina e submetidos à sepse polimicrobiana por CLP.....	39
Figura 6 - Avaliação da atividade da enzima antioxidante SOD no hipocampo em ratos que receberam STC-1 ou salina e submetidos à sepse polimicrobiana por CLP.....	40
Figura 7 - Avaliação da atividade da enzima antioxidante CAT no hipocampo em ratos que receberam STC-1 ou salina e submetidos à sepse polimicrobiana por CLP.....	41
Figura 8 - Efeito da administração de STC-1 no tempo de latência no teste de esQUIVA inibitória, 10 dias após a indução de sepse por CLP.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1.1 Definição de Seps e aspectos epidemiológicos	15
1.1.2 Fisiopatologia da seps	18
1.1.3 Sistema nervoso central e seps	19
1.1.4 Estresse oxidativo na seps	21
1.1.5 Stanniocalcina-1	23
1.1.6 Modelos animais de seps	25
1.1.6.1 Ligação e perfuração cecal (CLP)	26
2. OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MÉTODOS	29
3.1 TIPO DE ESTUDO	29
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	29
3.3 MODELO ANIMAL	29
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	29
3.4.1 Indução de seps	31
3.5 ENSAIOS LABORATORIAIS	31
3.5.1 Determinação de Nitrito/Nitrato	31
3.5.2 Dano em lipídios pelos níveis de Substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	31
3.5.3 Carbonilação proteica	32
3.5.4 Atividade de Enzimas Antioxidantes	32
3.5.5 Quantificação de proteínas	33
3.5.6 Esquiva inibitória	33
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
3.7 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	34
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46

ANEXO A - Parecer Aprovação da Comissão de Ética	54
---	-----------

1. INTRODUÇÃO

A sepse é definida como uma resposta inflamatória sistêmica causada por agente infeccioso, onde há um desequilíbrio entre moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, no qual o agravamento de suas consequências são as mais comuns causas de mortes em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs)^{1,2}. Alguns estudos vêm sendo realizados com a finalidade de compreender melhor o desenvolvimento da doença, para assim, melhorar o tratamento e diminuir a mortalidade dos pacientes²⁻⁴

No Brasil, um estudo coordenado pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), aponta que cerca de 17% dos leitos de UTIs são ocupados por pacientes com sepse grave. No que se refere à taxa de mortalidade, chega a alcançar 55% dos pacientes que apresentam sepse nas UTIs brasileiras, sendo que este índice pode ser maior, pelo fato de poucos hospitais brasileiros serem credenciados pelo ILAS⁵. Além da grande mortalidade, há uma incidência global anual estimada entre 15 a 19 milhões de casos, gerando um custo exacerbado para o sistema de saúde³.

O desenvolvimento da sepse deve-se à complexa interação entre patógenos e as células do hospedeiro com o reconhecimento do microrganismo, através de estruturas expressas na célula, denominadas Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs)⁴. Deste modo, ocorre à ativação da resposta inflamatória envolvendo uma grande variedade de moléculas pró-inflamatórias sinalizadoras como prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e quimiocinas e que chegam até a corrente sanguínea⁶. A resposta inflamatória pode determinar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), gerando o estresse oxidativo, o qual é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de enzimas oxidantes e antioxidantes, ampliando a lesão celular e disfunção orgânica⁷.

Nesse sentido, quando a sepse é desencadeada, pode ocorrer a perda progressiva da função de vários órgãos, incluindo o cérebro, levando a um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). O cérebro é um dos primeiros órgãos afetados durante o desenvolvimento da sepse, resultando em disfunção cerebral aguda e de longo prazo caracterizada pela disfunção cognitiva sendo verificado tanto em modelos animais quanto em humanos⁸.

Apesar dos mecanismos associados com o comprometimento cognitivo não estarem bem entendidos, sabe-se que alterações precoces após a sepse no

hipocampo estão relacionadas com o comprometimento cognitivo observado em modelos animais como: alteração do fluxo sanguíneo cerebral, estresse oxidativo e alterações da BHE^{9,10}. Essas alterações da BHE podem levar a uma importante condição patológica na sepse, a encefalopatia associada à sepse (EAS)¹¹⁻¹³. A EAS pode ocorrer em 8-70% dos pacientes sépticos, dependendo dos critérios de inclusão empregados, sendo mais frequentemente observada em UTIs^{14,15} e está associada a uma alta mortalidade, permanência aumentada em UTIs e maiores gastos para a saúde pública¹⁶.

A EAS pode ser definida como um distúrbio cerebral e metabólico resultante da alteração da sinalização celular no que se refere às respostas imunes¹⁷, caracterizada pelo comprometimento da atenção, concentração, confusão, desorientação e progredindo para a diminuição da consciência e em sua última fase, o coma¹⁸. Uma vez que se presume ser totalmente reversível, a EAS pode levar nos sobreviventes da doença à disfunção neurocognitiva permanente e deficiências funcionais, mesmo após a recuperação do paciente¹³.

Um estudo realizado por Iwashyna e colaboradores, acompanhou pacientes durante oito anos após um quadro de sepse grave e demonstrou que a longo prazo a gravidade do declínio funcional e o comprometimento cognitivo estão aumentados significativamente nestes pacientes¹⁹. Outros estudos mostram que após a sepse, pacientes mostram uma dessincronização na função cerebral, associando este evento a uma função cognitiva prejudicada^{20,21}. De 6-24 meses após o episódio da doença, foi relatado uma diminuição na capacidade verbal destes pacientes, e até mesmo a uma atrofia de regiões cerebrais, como a diminuição do volume do hipocampo^{20,21}.

A sepse pode resultar de um desequilíbrio da resposta inflamatória sendo potencializado o perfil pró-inflamatório e potencialmente aumentar a suscetibilidade do cérebro a doenças neurodegenerativas, deterioração adicional da capacidade cognitiva e riscos de desenvolver demência na vida adulta¹³. As principais oportunidades para a intervenção neuroprotetoras para pessoas que sobrevivem à sepse podem ser perdidas, porque as consequências neurocognitivas e funcionais de longo prazo da sepse não são totalmente caracterizadas¹³.

Nessas circunstâncias, pesquisadores buscam novos alvos moleculares envolvidos na fisiopatologia da sepse e a sua possível intervenção, na busca da

redução da resposta inflamatória exacerbada e do estresse oxidativo a fim de tentar amenizar os danos cerebrais causados pela doença.

A Stanniocalcina-1 (STC-1) é um hormônio glicoproteico originalmente encontrado em peixes ósseos, onde regula a homeostase de cálcio/fosfato²². A função da STC-1 em peixes é prevenir a hipercalcemia com a inibição do influxo de cálcio (Ca⁺) através das brânquias e do intestino, e estimular a reabsorção do fosfato pelos rins^{22,23}. Em mamíferos STC-1 é amplamente expressa e conservada em uma variedade de tecidos, incluindo coração, pulmão, fígado, glândula supra-renal, ovário, próstata, cólon, osso, baço e cérebro^{22,24}.

Entre os seus efeitos biológicos, nos macrófagos a STC-1 diminui o Ca⁺ intracelular e a mobilidade celular, atenua a resposta aos quimiotráticos e diminui a geração de superóxido através da indução das proteínas desacopladoras mitocondriais (*UCPs do inglês Mitochondrial Decoupling Proteins*), que por sua vez, pode reduzir a formação de EROs e suprimir a migração de leucócitos via transendotelial^{23,25}. Em células endoteliais tratadas com citocinas, STC-1 atenua a geração de superóxido e a ativação de vias pró-inflamatórias como a ativação de Fator Nuclear kappa B (NF-κB), ativa vias antioxidantes e exibe ação citoprotetora²⁵.

Neste sentido, sabe-se que pacientes com sepse apresentam dano cerebral, e que os mecanismos envolvidos estão relacionados com o estresse oxidativo, neuroinflamação, apoptose neural e deficiência no metabolismo oxidativo cerebral ou uma soma de todos esses fatores. No entanto, não está bem definida uma explicação da fisiopatologia no dano cerebral e das alterações que pacientes desenvolvem na sepse. Sendo assim o propósito desse trabalho foi avaliar o envolvimento da STC-1 sobre os parâmetros de estresse oxidativo cerebral precoces e a resposta tardia sobre o déficit de memória em ratos submetidos à sepse polimicrobiana severa.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Definição de Sepse e aspectos epidemiológicos

O primeiro consenso de sepse era definido como uma resposta inflamatória sistêmica frente a uma infecção, iniciando um processo gradual de dano tecidual, onde a disfunção múltipla de órgãos é a sua mais séria expressão. Para o seu

diagnóstico usava-se os critérios da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) associada a uma infecção²⁶. Em 1991, a American College of Chest Physicians e a Society of Critical Care Medicine, chegaram às atuais definições da doença, onde classificaram em etapas conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Definições sobre sepse e condições relacionadas, criado em 1991.

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

múltiplos órgãos

Fonte: Adaptado de American College of Chest Physicians e a Society of Critical Care Medicine.

No entanto, sabe-se que a sepse esta relacionada também a outros aspectos fisiopatológicos como a disfunção orgânica, por exemplo. Desta forma, usar apenas critérios SIRS levava a avaliação de apenas um aspecto da doença, excluindo os outros aspectos fisiopatológicos²⁶.

No último consenso publicado no início de 2016, a sepse passou a ser definida como disfunção de órgãos com potencial risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente à infecção²⁷. Em outras palavras, a sepse passa a ser definida como um processo infeccioso com a presença de disfunção orgânica. Com a nova definição, extinguiu-se a nomenclatura sepse grave, que indicava a sepse associada à disfunção orgânica, mantendo-se apenas os termos sepse e choque séptico, este último utilizado quando há hipotensão refrataria a reposição volêmica e o uso de vasopressores²⁷.

Associado a isso, recomendou-se diagnosticar a disfunção orgânica através do escore de avaliação sequencial de falência de órgãos (quickSOFA, do inglês quick Sequential Organ Failure Assessment) que é a medida sequencial rápida de falência orgânica, a qual analisa frequência respiratória, pressão sanguínea sistólica e alterações do estado mental²⁷. A disfunção orgânica é a característica mais acentuada da sepse, quanto maior o número de órgãos em falência pior o prognóstico do paciente, onde cada órgão em disfunção representa um acréscimo de 15-20% na mortalidade²⁸. Uma das disfunções orgânicas na sepse que vem ganhando maior número de evidências é a disfunção neurológica, uma vez que representa elevação da morbidade e mortalidade de curto e longo prazo^{29,30}.

No estudo clássico de Sprung e colaboradores, a taxa de mortalidade de pacientes sépticos com estado mental alterado foi de 49% em comparação a uma taxa de 26% em pacientes sépticos sem sintomas neurológicos¹⁸. Em nível mundial, estudos mostram que entre os sobreviventes, 70% manifestam comprometimento cognitivo agudo, e outros 45% apresentam alterações cognitivas por até um ano após a alta hospitalar, o que gera diminuição na qualidade de vida³⁰⁻³². Dados epidemiológicos sugerem cerca de 70% de todos os pacientes que sofrem de síndrome de resposta inflamatória sistêmica com infecção nas UTIs desenvolvem disfunção cerebral grave³³⁻³⁵.

No Brasil, a incidência total de sepse é de 55%, com mortalidade em torno de 33,9% com 32% dos pacientes manifestando alterações neurológicas ainda na UTI⁵. Apesar dos progressos significativos na gestão de pacientes sépticos, a sepse continua sendo um grande problema de saúde pública que afeta milhões de pacientes em todo o mundo a cada ano. Além de comprometer a qualidade de vida e a perda da capacidade produtiva referindo-se aos danos neurológicos em longo prazo em pacientes sobreviventes da doença^{33,34}.

Portanto é importante o melhor entendimento da sua fisiopatologia associado à busca de novos alvos moleculares e estratégias de tratamento mais eficazes para a sepse³⁴.

1.1.2 Fisiopatologia da sepse

A sepse continua sendo um problema crítico com morbidade e mortalidade significativas, mesmo na era moderna de gerenciamentos de cuidados intensivos³⁶. A fisiopatologia da sepse está relacionada com a interação complexa entre o hospedeiro e o agente infectante, onde o sistema imunológico será ativado, mobilizando neutrófilos, macrófagos e outras células imunológicas para a eliminação do patógeno de forma alterada⁴.

As respostas imunes são iniciadas pelo Receptor de Reconhecimento de Padrões (RRP), presentes em leucócitos, macrófagos e células dendríticas, no qual são ativados com o reconhecimento dos microrganismos através de estruturas expressas na superfície dos patógenos, denominadas PAMPs^{2,4} como o Lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias gram-negativas, e o ácido lipoteicóico das bactérias gram-positivas⁴.

Os PAMPs são reconhecidos pelos RRP, os quais são expressos por células do sistema imune inato podendo ser representados pelos receptores *Toll-like* (TLR)². Os receptores *Toll-like* desempenham um papel importante no reconhecimento de patógenos e no início de respostas inflamatórias e imunes⁶. A estimulação de receptores *Toll-like* por infecção microbiana leva à ativação de vias de sinalização que resultam na indução de gene antimicrobiano e citocinas inflamatórias⁶.

Quando ocorre a interação entre PAMPs-TLR4, é iniciada a ativação do sistema imunológico com a finalidade de coordenar uma resposta defensiva envolvendo componentes humorais e celulares. Com isso há uma liberação de

moléculas sinalizadoras, que desencadeiam a resposta inflamatória. Sendo assim, é desencadeada a transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias por meio da ativação do fator de transcrição NF- κ B^{6,37}. Como consequência, mediadores pró-inflamatórios são produzidos como o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), Interleucina-1 β (IL-1 β), e Interleucina-IL-6 (IL-6), que, por sua vez favorecem uma intensa resposta celular com liberação de mediadores secundários³⁷.

Isso sinaliza às células endoteliais para regular as moléculas de adesão e iniciarem o recrutamento de outras células inflamatórias para controlar a infecção. Estas células inflamatórias recrutadas, incluindo as células fagocitárias (polimorfonucleares, monócitos e macrófagos) da resposta imune inata e os linfócitos da resposta imune adaptativa frequentemente se tornam disfuncionais na sepse³⁶.

A resposta inflamatória exacerbada determina a produção de EROs, gerando o estresse oxidativo, no qual é caracterizado pelo desequilíbrio entre produção de enzimas oxidantes e antioxidantes, o acentuado estresse oxidativo como resultado da resposta inflamatória inerentes à sepse inicia mudanças na função mitocondrial ampliando a lesão celular e a disfunção orgânica^{7,38}, incluindo o cérebro e caracterizando a EAS^{7,11,12}.

1.1.3 Sistema nervoso central e sepse

O sistema nervoso central (SNC) historicamente tem sido considerado um órgão imunoprivilegiado, sem sistema linfático, protegido do sistema circulatório pela BHE e tem em sua composição, células que estão diretamente ou indiretamente envolvidas em respostas imunes^{39,40}. Durante a sepse, o cérebro é um dos primeiros órgãos a serem afetados levando ao desenvolvimento da disfunção cerebral aguda e déficit cognitivo a longo prazo^{41,42}.

A fisiopatologia da disfunção cerebral aguda e a longo prazo é altamente complexa, resultante de processos inflamatórios e neuroquímicos, que podem induzir alterações significativas em áreas vulneráveis do cérebro. Mecanismos importantes incluem ativação endotelial pela resposta inflamatória periférica, aumento da permeabilidade da BHE, ocorrendo uma infiltração de leucócitos, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), ativação da micróglia e astrócitos, morte celular por apoptose^{35,43} e neurotransmissão alterada⁴⁴.

Especificamente, o SNC e sua vasculatura são responsáveis por funções fisiológicas importantes durante a sepse e são também particularmente vulneráveis a lesões sob tais condições. No SNC, as células endoteliais fazem parte da BHE, impedindo a difusão para o SNC de fatores solúveis polares (íons, peptídeos, proteínas, anticorpos, etc.). Durante a infecção sistêmica, as superfícies luminais das células vasculares cerebrais são expostas a um conjunto complexo de estímulos incluindo PAMPs, citocinas e quimiocinas. Estes estímulos conduzem a alterações na fisiologia vascular do SNC aumentando a permeabilidade da BHE⁴⁵. Na sepse, o dano estrutural da BHE é generalizado, e o parênquima cerebral se torna susceptível a uma resposta inflamatória local com o aumento dos níveis de citocinas como TNF- α ⁴⁶.

Além do aumento da resposta inflamatória com gênese periférica, verificou-se recentemente que a resposta neuroinflamatória está acompanhada pela produção microglial de EROs, contribuindo para a progressão da neuroinflamação e consequentemente maior dano celular na BHE, alterando ainda mais sua permeabilidade já comprometida devido a sua resposta frente as alterações periféricas⁴⁷. Ao mesmo tempo, células gliais, como micróglia, macrófagos perivascularres e astrócitos interagem com BHE, podendo causar respostas que potencializam a elevação de sua permeabilidade na direção encéfalo-sangue periférico^{48,49}.

É cabível entender que inflamação periférica é diferente de neuroinflamação, especialmente devido aos astrócitos e micróglia, que são células específicas do SNC⁴¹. A micróglia compreende aproximadamente 12% do total das células do cérebro e é a segunda célula glial mais abundante⁵⁰. Geralmente estão em estado latente, mas podem se tornar ativas após uma lesão ou infecção agindo com um duplo papel que pode ser protetor ou prejudicial dependendo de seu estado de ativação. Uma função crucial da micróglia é a capacidade de gerar respostas imunes inatas e adaptativas significativas^{39,51}.

A ativação microglial representa umas das primeiras alterações observadas na EAS e a ativação prolongada pode afetar negativamente outras células cerebrais⁵². A ativação inicial da micróglia na sepse foi evidenciada em modelos de camundongos dentro de 4 horas após a injeção de LPS, conforme avaliado pelo aumento do nível de IL1- β ⁵³. Em outro estudo usando imagens de tomografia em primatas, verificou-se a ativação da micróglia apenas 1 hora após a inflamação

sistêmica induzida por LPS⁵⁴. Particularmente, o hipocampo parece ser suscetível a resposta neuroinflamatória resultante da ativação microglial. O processo inflamatório mediado por IL1- β no hipocampo foi confirmado em diferentes modelos de inflamação incluindo ligação e perfuração cecal, e os mediadores pró-inflamatórios liberados no SNC no início da sepse, por sua vez levam à perda neuronal hipocampal⁵⁵⁻⁵⁹.

Adicionalmente, com a presença de neutrófilos ativados e função mitocondrial comprometida devido a neuroinflamação, ocorre uma produção aumentada de EROs contribuindo com a potencialização do aumento da permeabilidade da BHE, resultando em edema perivascular e rompimento de astrócitos hipocampais^{10,60,61}. Tais eventos associam-se a extensa lesão neuronal tardia e, assim, existe a possibilidade dos pacientes que se recuperaram da doença apresentarem déficits neurológicos a longo prazo⁶² especialmente a memória e a cognição⁶³.

O processo de aprendizagem e memória depende em grande parte do hipocampo e esta região expressa a maior densidade de receptores de IL1- β , tornando-o vulnerável às consequências adversas da neuroinflamação como o estresse oxidativo^{64,65}. Ainda, embora IL1- β seja necessária para processos normais de aprendizado e memória, seus níveis em excesso afetam o comportamento cognitivo^{66,67}. A interação entre IL1- β e outras citocinas, como TNF- α e a IL-6, aumenta ainda mais essa disfunção⁶⁸. Esses achados representam uma base neuropatológica para o comprometimento cognitivo persistente e atrofia do hipocampo observadas em sobreviventes à sepse¹⁸.

1.1.4 Estresse oxidativo na sepse

Estresse oxidativo é considerado como um distúrbio na função regular do organismo, causado por um desequilíbrio entre o sistema oxidante e antioxidante das células e tecidos, e em contrapartida, uma superprodução de EROs^{69,70}. O excesso de EROs podem danificar proteínas celulares, lipídios e ácidos nucleicos levando a disfunção celular e do controle do ciclo celular, mutações genéticas, alterações no mecanismo de transporte celular e inflamação⁷⁰.

As EROs podem ser divididas em dois grupos: radicais livres e não radicais. As moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, dando reatividade às moléculas são chamadas de radicais livres. Os três principais EROs são o ânion

superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^\cdot$)⁷¹. Eles podem ser gerados pela atividade de enzimas como Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, ciclooxigenase, e durante a atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial⁷².

Nas primeiras fases da resposta inflamatória, via ativação de neutrófilos ou o desequilíbrio do funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, ocorre o aumento na produção de O_2^- , o qual reage rapidamente com o óxido nítrico (ON) formando peroxinitrito ($ONOO^-$), que é uma ERNs, onde sua molécula é altamente tóxica^{73,74}. O $ONOO^-$ contribui para a disfunção endotelial e também na ocorrência da disfunção orgânica, como evidenciado no choque séptico⁷⁴. Por outra via, o O_2^- leva a formação de H_2O_2 e posteriormente, com a presença de ferro ou cobre, ocorre à formação do potente radical hidroxila $OH^\cdot$ na conhecida reação de Fenton e, assim, induzem o estresse oxidativo em decorrência do déficit de enzimas antioxidantes⁷¹.

No que se refere ao sistema antioxidante, uma vez que a célula é o principal local da produção de radicais livres, ela também apresenta um sistema de defesa, ou seja, contém antioxidantes a fim de minimizar o estresse induzido pelas EROs⁷⁵. Este mecanismo antioxidante é composto por defesas enzimáticas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx)⁷².

A SOD é um antioxidante enzimático intracelular que catalisa a conversão do O_2^- para oxigênio e H_2O_2 ⁷⁵. A CAT é uma enzima presente no peroxissoma de célula aeróbicas que ocasiona a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio molecular⁷⁵. Enquanto a GPx, é o mais abundante antioxidante mitocondrial, agindo sobre o H_2O_2 , e exercendo um papel importante na estabilidade das moléculas e função mitocondrial⁷⁶.

Em concentrações elevadas, as EROs geram o estresse oxidativo, ou seja, um processo deletério celular a lipídios de membrana, proteínas e DNA⁷⁷, além da ativação de vários fatores de transcrição induzidos por estresse e a produção de citocinas pró-inflamatórias²⁷. A peroxidação lipídica ocorre, por exemplo, quando o excesso de radicais hidroxil e de peroxinitrito danificam as membranas celulares e das lipoproteínas, conduzindo a formação de malondialdeído (MDA) e compostos conjugados que são citotóxicos e mutagênicos⁷⁸. O dano em proteínas através das EROs e ERNs leva à mudança estrutural e perda da atividade enzimática. Além

disso, o dano oxidativo ao DNA acarreta diferentes lesões oxidativas que podem causar mutações celulares e o desenvolvimento de diversas doenças⁷⁸.

Na fisiopatologia da sepse, ocorre um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, gerando um excesso de EROs, e consequentemente dano às células³⁷⁻⁴⁰. Entre as estruturas celulares alvo do estresse oxidativo na sepse encontra-se a mitocôndria, com alteração na sua estrutura e função⁷⁶. E essa disfunção mitocondrial também pode em decorrência do dano levar a produção aumentada de EROs e ERNs⁷⁶. Associado à alteração da função mitocondrial na sepse, com o aumento das citocinas pró-inflamatórias, ocorre o aumento da infiltração no tecido por células fagocitárias⁷⁷. Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) e monócitos/macrófagos respondem ao estímulo inflamatório com a produção de EROs e ERNs³⁵.

O cérebro é particularmente suscetível ao estresse oxidativo, pois utiliza altas taxas de oxigênio, quando comparado a outros órgãos⁷⁹. Suas defesas antioxidantes são modestas; as mitocôndrias geram ânion superóxido e as membranas neurais são ricas em ácidos graxos polinsaturados. Desta forma, os produtos da lipoperoxidação podem causar dano cerebral⁷⁹.

Estudos experimentais apontam o desenvolvimento de estresse oxidativo com relação a EAS e suas consequências^{46,80}. Foi verificado um aumento no dano oxidativo em proteínas e lipídios no hipocampo, córtex, cerebelo e estriado entre zero e 96 horas após a indução de sepse polimicrobiana em ratos⁶². Dados mostram que os radicais livres induzem, adicionalmente, a apoptose neural no hipocampo e, como resultado, podem provocar déficit cognitivo no mesmo modelo animal⁸¹.

Embora alguns mecanismos relacionados à fisiopatologia da EAS já tenham sido apresentados, o tratamento e diagnóstico ainda são complexos. Existem opções limitadas para o tratamento da EAS, que se baseiam principalmente no controle dos sintomas, porém ainda não são totalmente eficazes¹⁸.

Nessas circunstâncias, a busca de alvos moleculares ligados as vias envolvidas na neurobiologia da EAS, como o estresse oxidativo e produção exacerbada de mediadores pró-inflamatórios, tem sido de grande interesse para a pesquisa intensivista.

1.1.5 Stanniocalcina-1

A STC é um hormônio glicoproteico que foi originalmente identificado nos Corpúsculos de Stannius (CS), uma glândula endócrina única localizada na superfície ventral dos rins dos peixes ósseos. Verificou-se a sua importância em regular a homeostase de cálcio/fosfato e proteger contra hipercalcemia tóxica^{82,83}. A remoção dos CS produz hipercalcemia comprovando sua influência sobre a homeostase de cálcio em peixes ósseos⁸⁴.

Altos níveis de cálcio extracelular promovem a síntese e a liberação de STC que ao entrar na corrente sanguínea reduz os níveis de transporte de cálcio atuando principalmente, nas guelras e no intestino dos peixes⁸⁵. A STC não é apenas responsável pela diminuição da captação de cálcio Ca^{+2} , mas também estimula reabsorção de fosfato inorgânico (Pi) pelo epitélio do túbulo proximal do rim dos peixes⁸⁶. Com base em outros estudos, entende-se que há presença de STC em outros tecidos como ovário, testículo e rim dos peixes ósseos^{87,88}.

Em mamíferos, a STC foi denominada STC-1, e inicialmente verificada em fibroblastos e tecido pulmonar fetal humanos^{89,90}. Posteriormente, STC-1 foi identificada com expressão abrangente em diversos tecidos como cérebro, baço, pulmão, coração e músculo esquelético, onde demonstra similaridade com STC dos peixes⁸⁹. Foi previamente sugerido que STC-1 não circula no sangue⁹¹, exceto durante a gestação e a lactação⁹², no entanto há relatos que sugerem que STC-1 em mamíferos é transmitido pelo sangue^{93,94}, provavelmente ligados a uma proteína solúvel⁹⁴.

A STC-1 em mamíferos, funciona de um modo autócrino/parácrino⁹¹. Apesar da função de STC-1 em mamíferos não estar bem definida, é cada vez maior o número de pesquisas relacionando a STC-1 com câncer, angiogênese e hipóxia, e evidências crescentes mostram que padrões alterados da expressão de STC-1 têm um papel no desenvolvimento de neoplasias, sugerindo que STC-1 desempenha um papel importante na fisiologia normal de muitos órgãos⁹⁵⁻⁹⁹. Relatos revelam a expressão de STC-1 em neurônios, mostrando neuroproteção e o aumento da resistência ao estresse hipóxico^{100,101}.

STC-1 é expressa em diferentes células, e existem resultados que sugerem a existência da proteína de ligação a STC-1¹⁰². Esta conclusão foi baseada em experimentos usando uma proteína de fusão fosfatase alcalina STC, que foi usada em ensaios de ligação, onde os locais de alta afinidade foram encontrados em células de rim, fígado, mama e ovários¹⁰²⁻¹⁰⁵. Essas análises sugerem que 90% de

seu sítio de ligação ocorrem nas mitocôndrias, e 10% ligam-se à superfície do seu receptor na membrana celular¹⁰⁰. Entre seus mecanismos de proteção, foram verificados que a STC-1 suprime a produção de EROs por meio da indução das UCPs, estabiliza a função de barreira endotelial, diminui a mobilidade e ativação de macrófagos, suprime a migração de leucócitos e inibe a sinalização inflamatória via alteração da expressão de NF- κ B^{83,101}.

Acredita-se que a STC-1 atue na diminuição da ativação de macrófagos durante a inflamação um estudo com STC-1 verificou que STC-1 internaliza em macrófagos e se localiza na mitocôndria sendo responsável pela diminuição da produção de ânion superóxido¹⁰⁶. Em outro estudo com células endoteliais tratadas com TNF α , a STC-1 atenuou a geração de EROs, diminuiu a migração de leucócitos e ativa as vias de sinalização inflamatórias JNK e NF- κ B²⁵. Em geral essas evidências mostram que STC-1 exerce efeito sobre mecanismos relacionados ao estresse oxidativo, e esta envolvida no processo de inflamação como um inibidor efetivo¹⁰⁷.

Apesar dos avanços na pesquisa científica na busca de novos agentes terapêuticos, há ainda uma elevada mortalidade e morbidade por sepse em UTIs. Há uma grande necessidade, portanto, de compreender melhor a patogênese desta doença e desenvolver modalidades de tratamento eficazes o que justifica a busca do conhecimento do envolvimento da STC-1 como modulador da disfunção cerebral no que se refere a sua potencialidade em diminuir a produção de EROs na sepse.

1.1.6 Modelos animais de sepse

Modelos animais empregados na pesquisa desempenham um papel importante criando réplica da condição da doença, sendo que o modelo deve imitar todas as informações relacionadas à fisiopatologia progressiva associada ao estado da doença, as quais são visualizadas em humanos¹⁰⁸. Apesar de alto custo e envolver o bem estar do animal, os modelos cirúrgicos são os mais relevantes, já que uma quantidade significativa de casos de sepse é resultado de infecção adquirida durante a cirurgia invasiva^{109,110}.

Um dos modelos utilizados é a de ligação e perfuração cecal (CLP)¹⁰⁸, onde é feito uma ligação intestinal seguida de uma perfuração no ceco com uma agulha a modo de vaziar o material fecal na cavidade abdominal induzindo a peritonite¹¹¹. A

utilização de meios cirúrgicos para a indução de sepse se mostra mais relevante, pois criam um foco infeccioso específico que pode disseminar ou causar uma resposta imune sistêmica, simulando com mais confiabilidade a fisiopatologia visualizada em humanos^{111,112}.

Frente a isso, o modelo de indução CLP é considerado a base da pesquisa da sepse, pois o mesmo deve mimetizar a ocorrência de hipotensão, vasodilatação, função cardiovascular, resposta ao tratamento e mortalidade vistas em pacientes com sepse. Além disso, o CLP recria a liberação progressiva de mediadores pró-inflamatórios. Portanto, CLP é considerada um dos modelos clinicamente mais relevantes de sepse¹¹².

1.1.6.1 Ligação e perfuração cecal (CLP)

Sepse é uma condição grave caracterizada por uma desregulada resposta inflamatória sistêmica. Para estudar a fisiopatologia da sepse, diversos modelos animais foram desenvolvidos. Sepse polimicrobiana por CLP é o modelo mais frequentemente utilizado, pois se assemelha à evolução e as características da sepse humana¹¹³.

A técnica de CLP foi implementada pelo grupo de I.H Chaudry há mais de 30 anos. Baseia-se na ligação do ceco abaixo da válvula íleo-cecal, seguido de uma perfuração do ceco, permitindo o vazamento do material fecal para a cavidade peritoneal. Subsequentemente, os animais desenvolvem sintomas típicos de sepse e com mortalidade similar ao que ocorre em UTIs¹¹³. Como o ceco exibe uma elevada carga bacteriana, a perfuração deste local resulta em peritonite polimicrobiana, translocação de bactérias para o sangue (bacteremia), choque séptico, disfunção de múltiplos órgãos e por fim, morte¹¹⁴.

A técnica de CLP alcançou sua popularidade por causa de sua facilidade, reprodutibilidade e semelhança com a doença humana. Mais uma vantagem do modelo é a possibilidade de controlar a mortalidade, o grau de contaminação bacteriana, a severidade da doença, pelo ajuste do tamanho da agulha ou pela quantidade de perfurações realizadas no ceco¹¹⁵.

Sendo assim, considerando que sepse é um grande problema em UTIs com alta incidência e altas taxas de mortalidade, o modelo de CLP é uma das melhores representações da sepse humana e fez importantes contribuições para o

conhecimento dos componentes inflamatórios envolvidos na sepse e na identificação de novos alvos terapêuticos. Considerado o modelo de CLP padrão ouro da sepse¹¹³.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de Stanniocalcina-1 sobre o estresse oxidativo hipocampal precoce e dano a memória a longo prazo em ratos submetidos à sepse polimicrobiana severa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de STC-1 sobre a concentração de nitrito/nitrato no hipocampo em 24 horas após a indução de sepse por CLP em ratos;
- Avaliar o efeito de STC-1 sobre o dano oxidativo em lipídios no hipocampo em 24 horas após a indução de sepse por CLP em ratos;
- Avaliar o efeito de STC-1 sobre o dano oxidativo em proteínas carbolinadas no hipocampo em 24 horas após a indução de sepse por CLP em ratos;
- Avaliar o efeito da STC-1 sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase no hipocampo em 24 horas após a indução de sepse por CLP em ratos;
- Avaliar o efeito da STC-1 sobre o dano a memória 10 dias após a indução de sepse por CLP em ratos.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental com modelo animal, de sepse polimicrobiana severa em ratos adultos, pelo método de CLP.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os reagentes utilizados para as análises bioquímicas foram: ácido tiobarbitúrico, dinitrofenilhidrazina, epinefrina, catalase de fígado bovino, hidroperóxido de tert-butila, albumina bovina, e reagente de Griess (Sigma, St. Louis, MO), ácido tricloroacético, ácido fosfórico, peróxido de hidrogênio, glicina, EDTA, (Labsynth, São Paulo, Brazil). No que se refere aos equipamentos, as análises foram avaliadas em Espectrofotômetro (U2010, Hitachi) (Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos/NEUROIMet- UNISUL) enquanto que para o teste de memória foi utilizada a esQUIVA inibitória da marca Insight (NEUROIMet).

3.3 MODELO ANIMAL

Foram utilizados ratos machos de linhagem Wistar de 60 dias de vida. Todos os animais foram mantidos em ciclos claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, tiveram livre acesso à água e alimento no Biotério da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL).

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

A primeira parte experimental foi realizada dividindo-se os animais em: Sham + salina; CLP + salina; CLP + 20ng/kg rhSTC-1; CLP + 50ng/kg rhSTC-1 e CLP + 100ng/kg rhSTC-1^{106,107,116}. Utilizou-se um n de 6 para Sham e um n 10 para CLP (n total = 46). Tanto salina quanto rhSTC-1 foram administrados por via intracerebroventricular na cisterna magna com o auxílio de um aparato estereotáxico e imediatamente a indução de sepse por CLP. Após 24 horas os ratos sofreram

morte indolor assistida (MIA) por overdose de tiopental (0,5 g/kg) sendo retirado o hipocampo para as análises de estresse oxidativo (Figura 1).

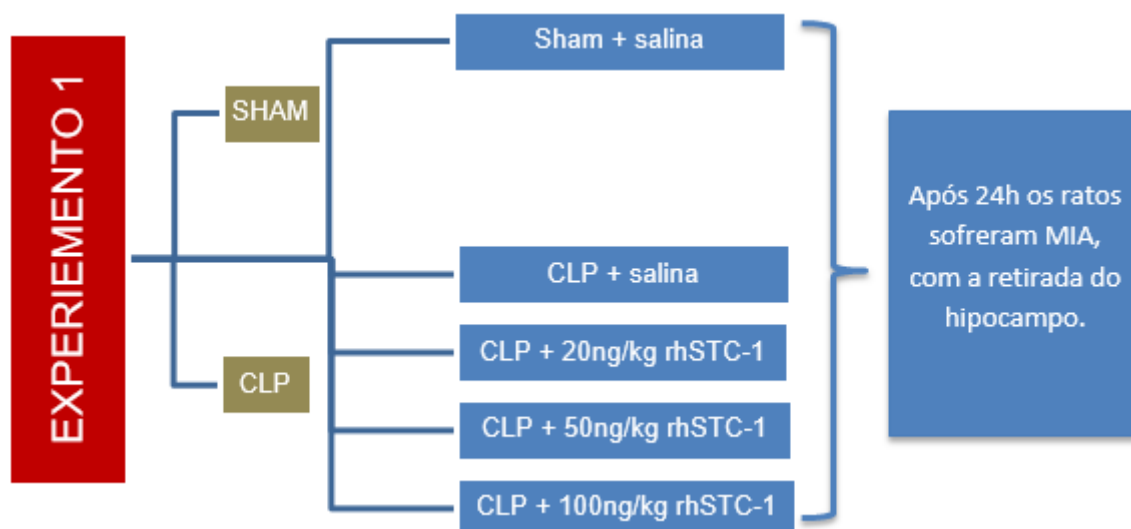


Figura 1 - Fluxograma do desenho experimental 1.

Outra parte experimental foi realizada para avaliação comportamental por meio do teste de esquia inibitória 10 dias após CLP. Os animais foram divididos em sham + salina; sham + rhSTC-1 100ng/kg; CLP + salina e CLP + rhSTC-1 100ng/kg. Utilizou-se n de 12 para sham e um n de 18 para CLP totalizando um (n = 60) (Figura 2).

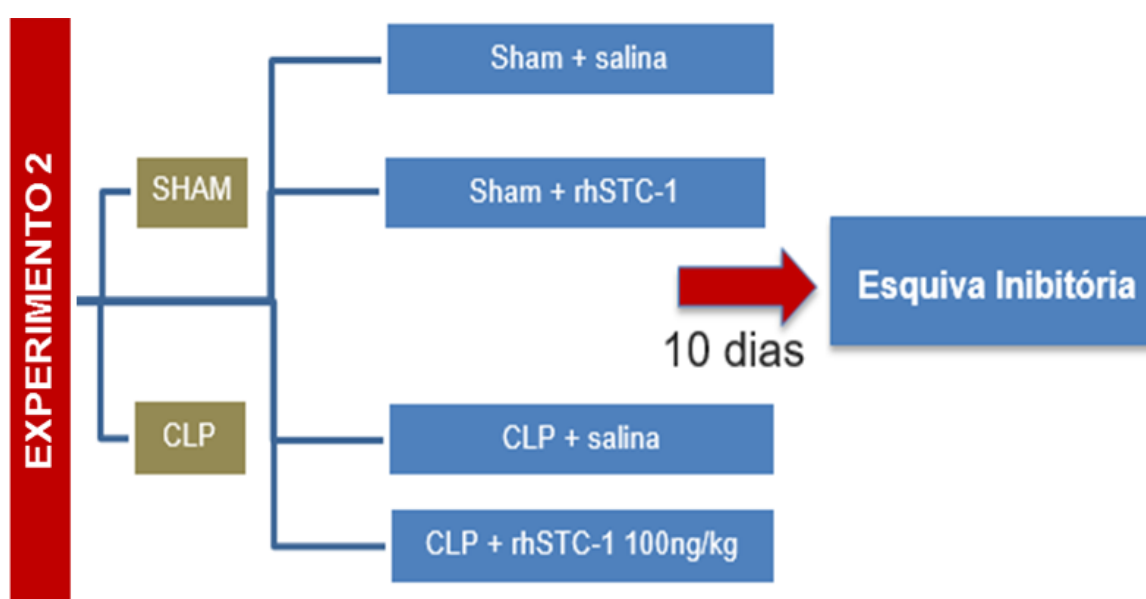


Figura 2 - Fluxograma do desenho experimental 2.

3.4.1 Indução de sepse

A sepse intra-abdominal foi produzida utilizando a técnica de CLP. Os ratos foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal. O ceco foi ligado abaixo da junção íleo-cecal com fio seda 3-0 e perfurado com uma agulha número 14, gentilmente comprimido até a extrusão de conteúdo fecal. Como controle foram utilizados animais submetidos à laparotomia, sem ligação ou perfuração cecal denominado grupo sham. Os planos cirúrgicos foram fechados e os ratos foram observados por duas horas. Todos os animais receberam salina em 50ml/kg imediatamente após o procedimento. No tempo 0 e 12 horas após a cirurgia todos os animais receberam antibioticoterapia com ceftriaxona (30mg/kg, s.c). Ainda de seis em seis horas receberam dipirona sódica (80mg/Kg, i.m.) para controle da dor pós operatória¹¹⁷.

3.5 ENSAIOS LABORATORIAIS

3.5.1 Determinação de Nitrito/Nitrato

A concentração de nitrito/nitrato foi avaliada como um indicativo de produção de ERNs. A concentração de nitrito/nitrato foi avaliada espectrofotometricamente usando o reagente de Griess [1% sulfanilamida em 5% ácido fosfórico e 0.1% N-1-N-dicloridrato de (1-naftil)-etilenodiamina em água purificada] e cloreto de vanádio (III) como previamente descrito¹¹⁸. Uma curva padrão é realizada simultaneamente com as amostras e a absorbância foi medida a 550nm. Os resultados da concentração de nitrito e nitrato foram expressos em nmol/mg de proteína.

3.5.2 Dano em lipídios pelos níveis de Substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A técnica de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação ácido-aquecida, como descrita previamente é usada como índice de dano oxidativo em lipídios¹¹⁹. Brevemente, 250 µl de amostra

homogeneizada foram precipitados com ácido tricloroacético a 10%, ao sobrenadante foi adicionado ácido tiobarbitúrico (0,67%). Seguido por incubação protegida da luz, em banho – maria a 100°C durante 30 min. Leitura da absorbância foi realizada em 535nm usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos em equivalentes de malondialdeído (nmol/mg de proteína). TBARS foi determinado pela absorbância a 535nm, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído nmol/mg de proteína.

3.5.3 Carbonilação proteica

O efeito do estresse oxidativo em proteínas foi avaliado por meio da determinação de grupos carbonil baseado na reação com dinitrofenilhidrazina. Resumidamente, as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina, e a absorbância foi aferida em 370nm. Os resultados foram expressos como níveis de proteínas carboniladas por miligrama de proteína (nmol/mg de proteína)¹²⁰.

3.5.4 Atividade de Enzimas Antioxidantes

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela capacidade de inibir espontaneamente a oxidação da adrenalina em adrenocromo. A SOD presente na amostra compete pelo radical O_2^- diminuindo a oxidação da adrenalina. Dessa forma a velocidade de formação do adrenocromo em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50mM em pH 10,2) e adrenalina (60mM), indica a atividade da SOD, a variação de absorbância é medida em 480nm. Uma unidade de SOD produz aproximadamente 50% de auto-oxidação de adrenalina. Os resultados foram expressos como U/mg de proteína¹²¹.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A reação utiliza o método que emprega H_2O_2 que deve ser convertido pela CAT em H_2O e O_2 . O tecido cerebral foi homogeneizado em tampão de fosfato 50mmol/ L (pH 7,0), e a suspensão resultante centrifugada a 3000 rpm durante 10 min. Uma alíquota de 100µl da amostra (20µl) será adicionada a 1000µl da mistura de substrato. A mistura de substrato contém

0,3ml de peróxido de hidrogênio em 50ml de tampão ao fosfato 0,05M (pH 7,0). Absorbâncias serão registradas em 240nm nos tempos zero, 30 e 60 segundos após o início da reação. Uma curva padrão foi estabelecida utilizando catalase purificada (Sigma, MO) em condições idênticas. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína¹²².

3.5.5 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método descrito por Lowry, Rosenbruogh e Randal, baseado na reação de Folin-Ciocalteu, sendo usada para normalização dos resultados das dosagens neuroquímicas¹²³.

3.5.6 Esquiva inibitória

O teste de esquiva inibitória foi utilizado para avaliar a memória aversiva. Utilizou-se uma caixa retangular acrílica de 50 x 25 x 25cm (Albarsch), que possui, no chão, barras paralelas de ferro (1 mm de diâmetro) com espaçamento de 1 cm e uma plataforma de 7 cm de largura e 2,5 cm de altura. Na seção de treino, os animais foram colocados na plataforma e contou-se o tempo de latência até que o animal encostasse com as quatro patas nas barras de ferro, por meio de contador automático. No momento em que o animal encostou nas barras de ferro, recebeu um choque de 0,2mA por dois segundos. Após 24 horas, realizou-se a seção de retenção, em que foi contado o tempo de latência até o animal descer da plataforma (no máximo 180 segundos), sem que o animal recebesse choque¹²⁴.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises bioquímicas, as diferenças entre grupos foram determinadas por análise de variância de uma via (Anova) e teste post hoc Tukey e de memória por teste t student's. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Dados sobre o tempo gasto na plataforma na esquiva inibitória foram expressos como mediana e intervalo interquartil e comparações entre os grupos por teste Mann–Whitney. Os grupos individuais foram avaliados por teste Wilcoxon's. Todas as análises foram

executadas utilizando o programa SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences) versão 20.0 e os gráficos apresentados foram construídos no Graphpadprism® versão 5.

3.7 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL, recebendo o parecer de aprovação conforme o protocolo 16.03.5.01.IV (Anexo A). A utilização dos animais seguiu os princípios da lei Arouca - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos - DBCA-2013¹²⁵.

4. RESULTADOS

Para a investigação do efeito da STC-1 no hipocampo de ratos submetidos a sepse no que se refere a possível formação de ERNs e EROs, foi avaliado o nível de nitrito/nitrato (N/N) (Figura 3). Foi verificado níveis aumentados de N/N no grupo CLP + salina quando comparado com o grupo sham + salina, assim como os demais grupos CLP. Quando comparado o grupo CLP + salina com os grupos que receberam STC-1 (CLP + STC-1 20ng, CLP + STC-1 50ng e CLP + STC-1 100ng), todos foram capazes de reduzir significativamente os níveis de N/N.

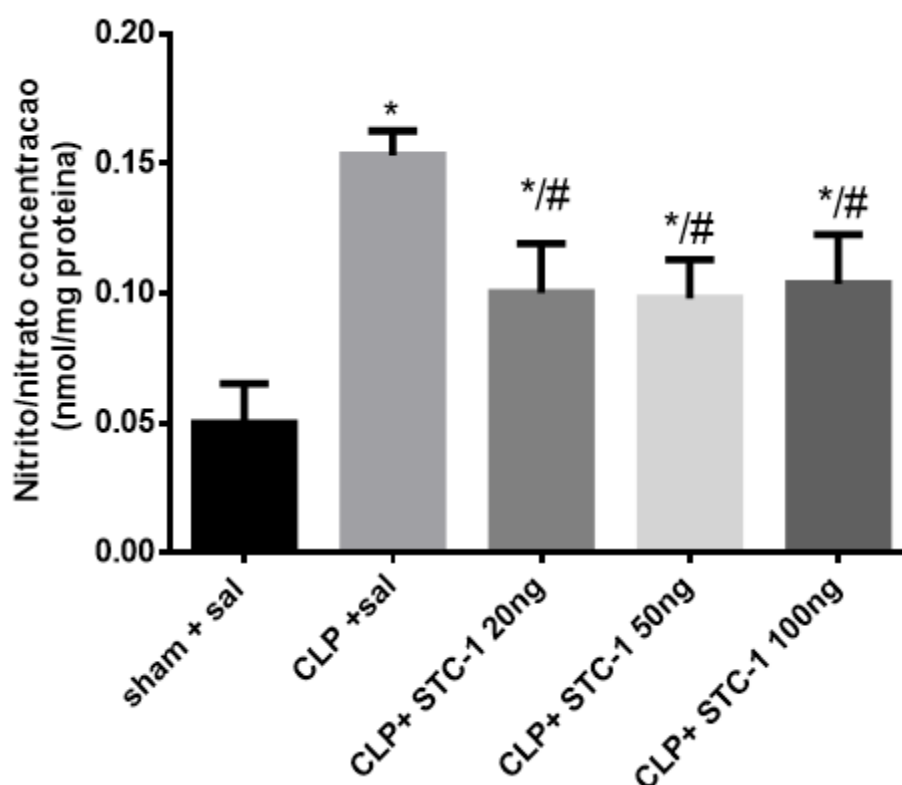


Figura 3 - Concentração de nitrito e nitrato no hipocampo em ratos que receberam STC-1 ou salina e submetidos à sepse polimicrobiana por CLP.

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão onde * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle e # comparado ao grupo CLP + salina (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey, $n=6$).

No que se refere as análises de dano oxidativo, verificou-se que, na avaliação ao dano em lipídios (Figura 4), expresso em equivalente a malondialdeído, no hipocampo, houve um aumento significativo de dano no grupo CLP + salina quando comparado ao grupo SHAM + salina. Porém estes níveis não foram revertidos com STC-1.

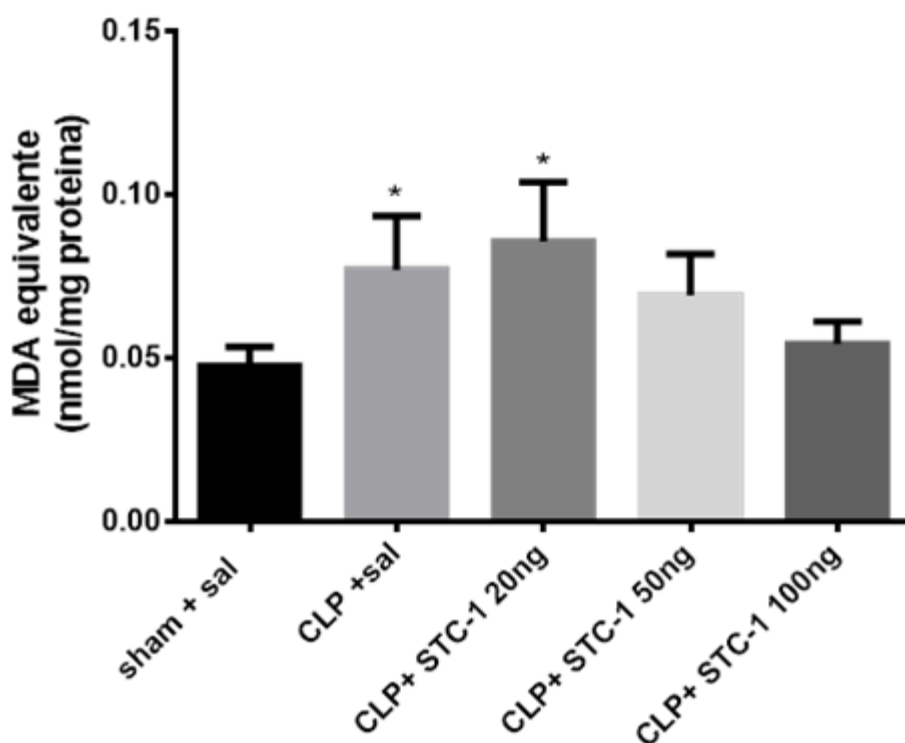


Figura 4 - Avaliação do dano em lipídios no hipocampo em ratos que receberam STC-1 ou salina e submetidos à sepse polimicrobiana por CLP.

Os dados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão considerados significativos * $p < 0,05$ comparado ao grupo sham + salina (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey, $n=6$).

Quando foi analisado o marcador de dano oxidativo em proteínas no hipocampo (Figura 5), verificou-se um aumento significativo da formação de proteínas carboniladas no grupo CLP + salina e CLP + STC-1 20ng quando comparados ao grupo SHAM + salina. Houve uma diminuição significativa dos níveis de proteínas carboniladas quando comparado o grupo STC-1 100ng aos grupos CLP + salina.

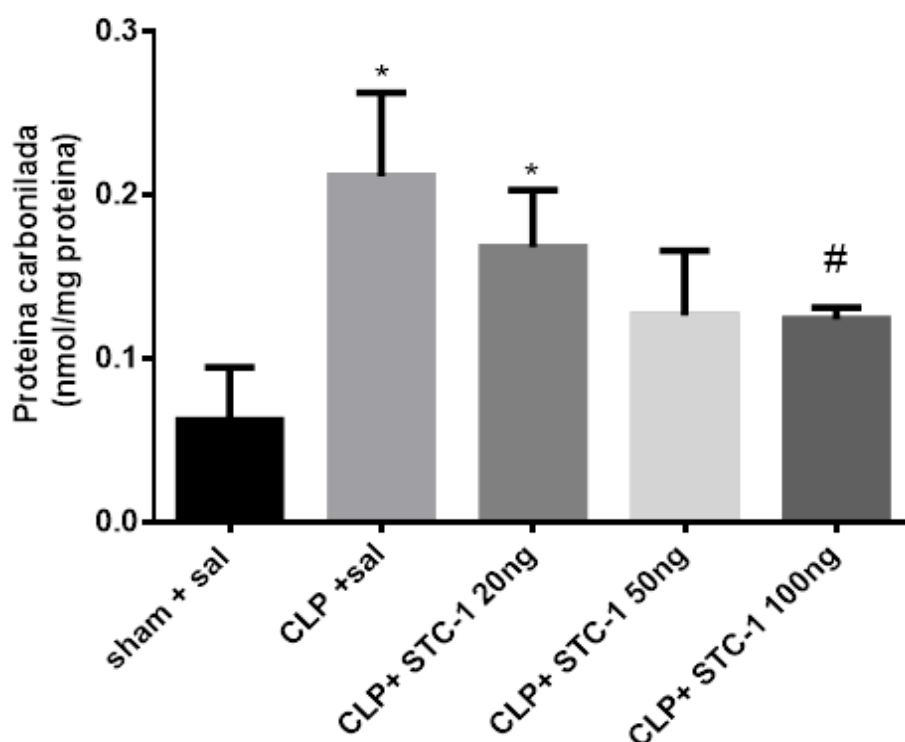


Figura 5 - Avaliação do nível de proteínas carboniladas no hipocampo em ratos que receberam STC-1 ou salina e submetidos à sepse polimicrobiana por CLP. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão onde * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle e # comparado ao grupo CLP + salina (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey, $n=6$).

No que se refere a atividade antioxidante, na avaliação da enzima SOD (Figura 6) o grupo CLP + salina demonstrou uma diminuição significativa de sua atividade quando comparado ao grupo sham + salina, sendo que, o grupo CLP + STC-1 100ng conseguiu recuperar significativamente a atividade desta enzima.

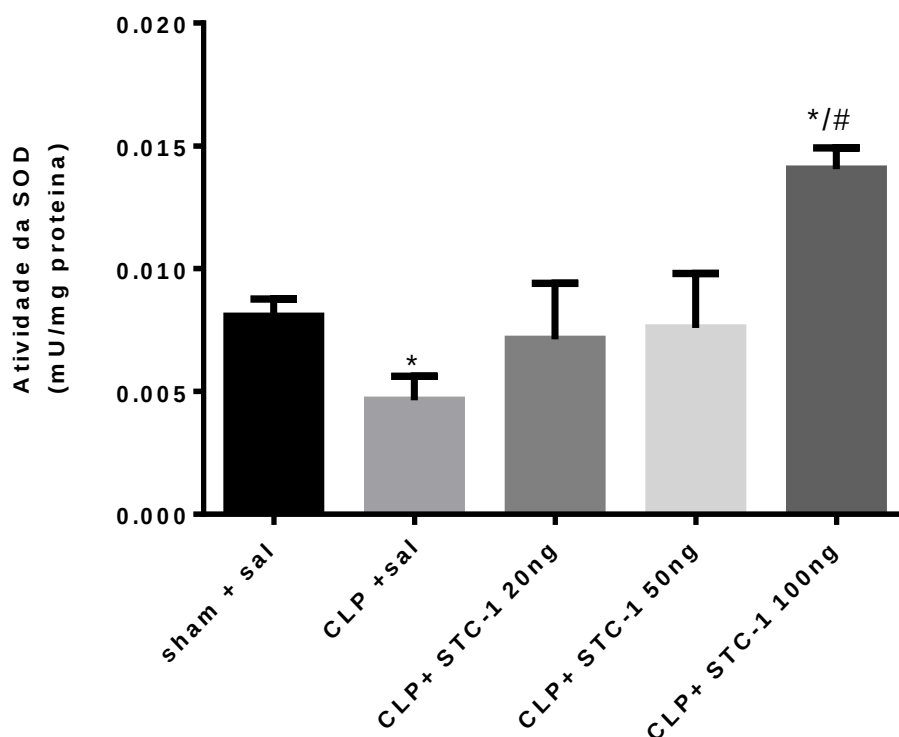


Figura 6 - Avaliação da atividade da enzima antioxidante SOD no hipocampo em ratos que receberam STC-1 ou salina e submetidos à sepse polimicrobiana por CLP. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão considerados significativos para $*p < 0,05$ comparados ao grupo SHAM + salina # comparado ao grupo CLP + salina (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey, $n=6$).

Os níveis da atividade da CAT (Figura 7) apresentaram-se diminuídos significativamente quando comparados o grupo CLP + salina com o grupo sham + salina, sendo que com STC-1, em todas as concentrações, não tiveram resultados significativos.

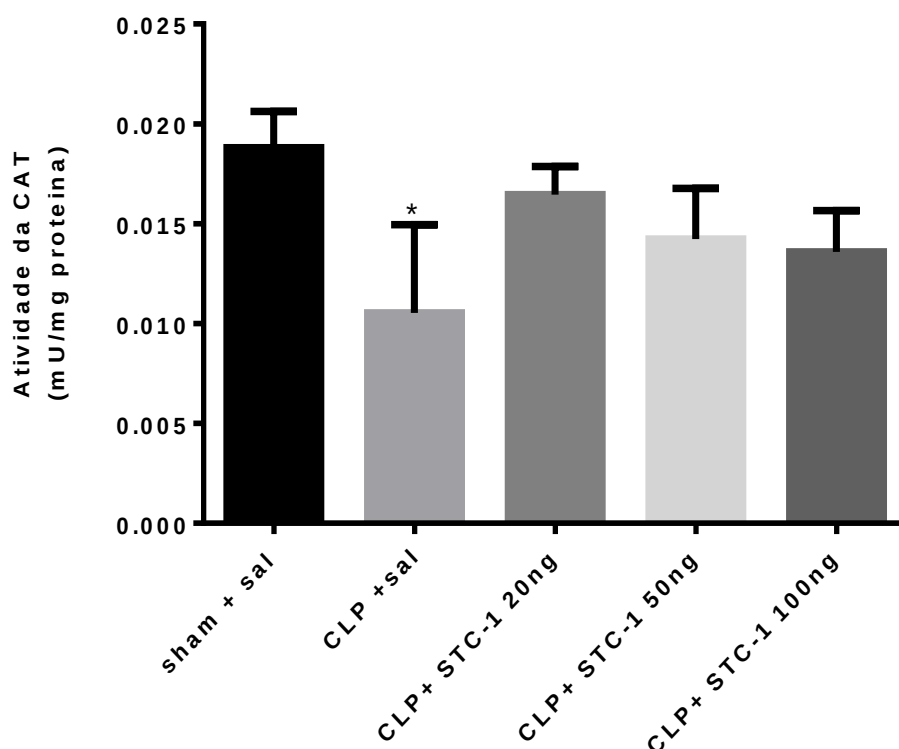


Figura 7 - Avaliação da atividade da enzima antioxidante CAT no hipocampo em ratos que receberam STC-1 ou salina e submetidos à sepse polimicrobiana por CLP. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão considerados significativos para $*p < 0,05$ comparado ao grupo sham + salina (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey, $n=6$).

Por fim, em longo prazo (10 dias após indução de sepse por CLP) avaliou-se a memória aversiva dos animais que receberam STC-1 e salina. A (Figura 8) demonstra que houve um aumento significativo do tempo de latência no teste nos grupos sham + salina, sham + STC-1 100ng e CLP + STC-1 100ng, quando comparado ao tempo de latência do treino, sugerindo que STC-1 100ng foi capaz de reverter danos de memória aversiva, já que, o grupo CLP+ salina não demonstrou alterações significativas no tempo de latência.

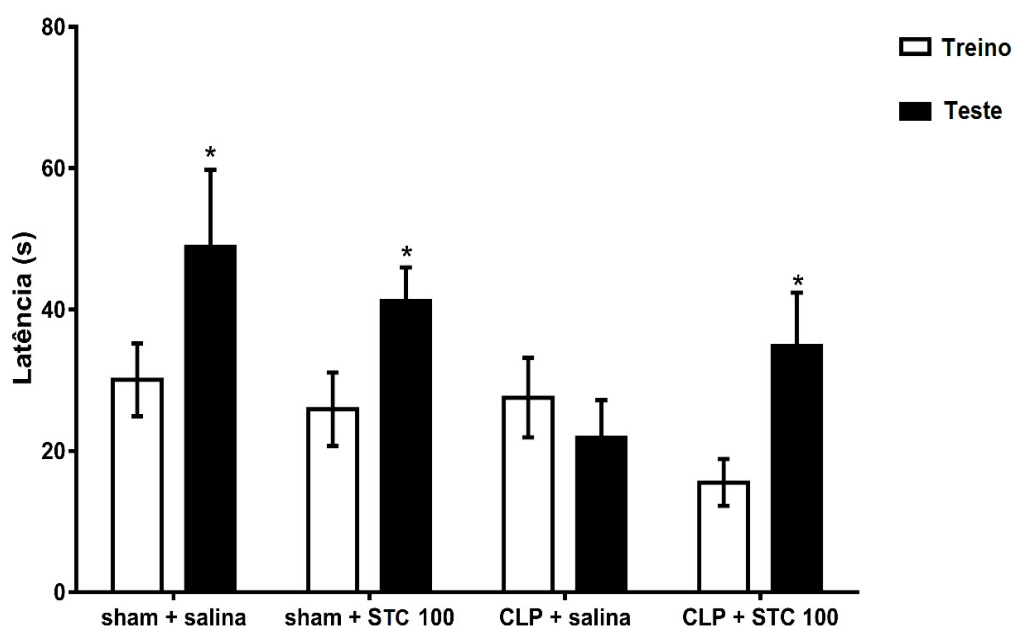


Figura 8 - Efeito da administração de STC-1 no tempo de latência no teste de esquiva inibitória, 10 dias após a indução de sepse por CLP.

Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$ quando comparado com o treino.

5. DISCUSSÃO

A sepse é a principal causa de morte nas UTIs, e continua sendo uma preocupação na área da saúde no mundo inteiro devido a sua alta morbidade e mortalidade¹. Sua fisiopatologia se inicia através da resposta inflamatória exacerbada decorrente da ativação do sistema imune estimulado por patógenos ou até mesmo por parte deles, como o LPS da parede celular de bactérias gram-negativas¹²⁶. Iniciando a resposta inflamatória, desencadeia-se uma cascata de sinalização sendo liberadas citocinas pró-inflamatórias, juntamente com marcadores do estresse oxidativo¹²⁷. A produção descontrolada de EROs desencadeia o estresse oxidativo, ampliando assim a resposta inflamatória, com disfunção celular culminando na disfunção orgânica¹²⁸.

Nesse contexto, a sepse além de estar associada à disfunção de múltiplos órgãos, inclui a disfunção cerebral, chamada EAS. Embora EAS não esteja bem entendida, alguns mecanismos tem sido propostos e envolvem danos celulares diretos ao cérebro, disfunção mitocondrial e endotelial e alterações da BHE^{129,130}. A partir das alterações na BHE, ocorre a infiltração de células do sistema imune e passagem de compostos tóxicos para o parênquima cerebral com ativação de células gliais, como a micróglia, que por sua vez resultará na potencialização da resposta neuroimune e de produção de EROs e ERNs¹³⁰.

O cérebro é particularmente suscetível às EROs, devido ao seu alto consumo de oxigênio¹³¹ e, durante a sepse, parece ser um dos primeiros órgãos afetados¹³². Os neurônios são as células mais dependentes de oxigênio dentre os tipos celulares do SNC¹³¹ e a degeneração mitocondrial com perturbação do funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial em decorrência do dano oxidativo têm sido observadas no cérebro de pacientes sépticos e em modelos animais^{133,134}.

EROs, somadas à liberação exacerbada de uma variedade de mediadores inflamatórios, podem agir direta ou indiretamente sobre a função mitocondrial e a produção de ATP¹³⁵. Entretanto, a eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial está comprometida na sepse, em parte, devido à lesão na membrana mitocondrial⁷⁶.

Consequentemente, os elétrons que normalmente fluíam através da cadeia transportadora de elétrons, são desviados para o ciclo da coenzima Q (transporte de elétrons no complexo III), gerando O₂⁻¹³⁶.

Wang et al. (2009) mostrou que a glicoproteína STC-1, foi responsável por diminuir o nível de ATP em macrófagos ativados por LPS, mas não afetou a atividade dos complexos da cadeia respiratória I-IV. Ainda, induziu a expressão da UCP 2 mitocondrial e como consequência, diminuiu a geração de O_2^{-106} . Os superóxidos são importantes para a função e viabilidade dos macrófagos, e as UCP 2 desempenham um papel na regulação da geração do O_2^- ; sendo assim ocorre o reconhecimento de que STC-1 diminua a geração de O_2^- em macrófagos por indução do UCP 2 colocando-o na vanguarda da imunidade e citoproteção¹³⁷.

Experimentalmente, em ratos sépticos, Chuang e colaboradores demonstraram um aumento na produção de O_2^- no tecido cerebral¹³⁸. Adicionalmente, níveis aumentados de óxido nítrico (NO) e de peroxinitrito ($ONOO^-$) no cérebro desempenham um papel crítico na função neuronal na sepse⁴⁶. De acordo com essas observações, no presente estudo, foi verificado um aumento no grupo CLP + salina comparado ao grupo sham + salina na produção de N/N um indicador da formação de ERNs como o $ONOO^-$, formado a partir da reação de O_2^- com NO. Ainda, conforme discutido anteriormente, a STC-1 exerce um papel importante na atenuação da geração de O_2^- via expressão de UCP-2 e interessante, verificou-se que para os animais submetidos a CLP e que receberam STC-1 nas diferentes doses, tiveram níveis diminuídos de N/N comparados aos que foram submetidos a sepse e receberam salina.

O tecido cerebral tem características únicas que o torna mais suscetível ao dano oxidativo devido a uma alta taxa metabólica de oxigênio como já mencionado além de níveis baixos de defesas antioxidantes em comparação com outros órgãos¹³¹. EROs e ERNs geradas durante a sepse iniciam a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas no cérebro e parênquima cerebral, devido a falência dos sistemas antioxidantes⁴⁶. Estas observações ocorrem já no início do curso do desenvolvimento da sepse e a terapia com a associação de antioxidantes em estudos prévios, atenuou o dano oxidativo no hipocampo e córtex^{9,139}.

Portanto, visto o envolvimento da resposta neuroinflamatória com a produção espécies reativas na sepse e que o estresse oxidativo ocorre quando a produção dessas espécies sobrecarrega a capacidade antioxidante e como alvo, biomoléculas como lipídios e proteínas^{7,136}. Buscou-se avaliar a o envolvimento da STC-1 na atenuação da peroxidação lipídica e dano em proteínas. Verificou-se que quando os animais foram submetidos a sepse, houve aumento de peroxidação lipídica e

carbonilação de proteínas no hipocampo em 24 horas após CLP e que a STC-1 foi efetiva em diminuir o dano somente sobre proteínas carboniladas e particularmente somente na dose de 100ng/kg.

Um estudo feito por Tang e colaboradores mostram que ratos submetidos à lesão pulmonar por LPS tiveram uma diminuição significativa na formação de proteínas carboniladas no tecido pulmonar quando submetidos ao pré-tratamento com STC-1, sugerindo que STC-1 tenha protegido contra a lesão pulmonar induzida por LPS²². No mesmo estudo, verificaram a atenuação dos níveis de nitrotirosina, um marcador de dano oxidativo proteico proveniente de ERNs²². Tal achado, vem ao encontro dos nossos resultados com a diminuição de N/N por STC-1 no hipocampo de ratos submetidos a sepse, conforme demonstrado acima.

Adicionalmente, considerando que a peroxidação lipídica e a carbonilação proteica são amplamente utilizadas como biomarcadores do estresse oxidativo, representando um espectro de modificações oxidativas, a quantificação dos conteúdos de grupos carbonila apresenta uma vantagem sobre os produtos da lipoperoxidação, pois as proteínas oxidadas geralmente são mais estáveis¹⁴⁰. Essa observação reforça a importância dos achados do estudo que embora a STC-1 não tenha resultado em diminuição de níveis de produtos da peroxidação lipídica, exerceu ação importante sobre a carbonilação proteica.

O mecanismo antioxidante enzimático é considerado uma defesa primária contra as ERNs e EROs causadoras de danos oxidativos em macromoléculas biológicas¹³¹. Com base em estudos prévios de que o desequilíbrio de antioxidantes pode contribuir para o dano oxidativo em regiões cerebrais após sepse experimental, verificamos^{9,139}, no presente estudo uma potencialização do déficit da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no hipocampo, quando a sepse foi induzida nos animais. Para a atividade da SOD, verificamos que a STC-1 foi eficiente no seu aumento para a dose de 100ng/kg o que não foi verificado para as demais doses.

Lui e colaboradores demonstraram que a STC-1 protege contra a injúria renal em modelo de isquemia e reperfusão por ativar diferentes vias envolvidas no aumento da produção da SOD⁸³. Por outro lado, a STC-1 não exerceu nenhum efeito sobre a atividade da enzima antioxidante CAT. Desse modo é possível que a STC-1 tenha exercido algum efeito sobre a atividade da enzima GPx e sua ação frente ao H₂O₂, o que pode ter contribuído para o efeito protetor contra o estresse oxidativo hipocampal neste modelo pré-clínico. Semmler e colaboradores (2007)

indicaram ainda, uma redução significativa na densidade dos neurônios na região CA1/CA2 do hipocampo após à sepse⁵⁸.

Desse modo, classicamente é sabido que as incapacidades cognitivas parecem estar relacionadas diretamente aos processos dependentes do hipocampo, danificando a memória¹⁴¹. Barrichello e colaboradores (2006) demonstraram que 10 dias após a indução de sepse por CLP, os ratos apresentaram diminuição da capacidade de memória aversiva, mostrando que o grupo sepse necessita aproximadamente duas vezes mais estímulos para alcançar o critério de aquisição de memória, quando comparado com o grupo sham, comprovando, assim, a dificuldade na aprendizagem e isso se mantém até 30 dias após a sepse⁶². Semmler e colaboradores (2007) mostraram que ratos submetidos à sepse pelo modelo LPS apresentaram após 3 meses, alterações comportamentais, dano neuronal em sub-regiões hipocampais e redução da inervação colinérgica em áreas corticais⁵⁸. Em pacientes, sabe-se que a sepse causa comprometimento da memória de longo prazo em até dois anos após a alta hospitalar¹³⁹.

Sabendo da possível extensa lesão neuronal, déficits neurológicos a longo prazo e alterações no processo de aprendizagem e memória, avaliou-se a memória aversiva dos animais por meio do teste de esquiva inibitória. Verificamos nesse sentido, que a administração de STC-1 com a dose de escolha de 100ng/kg em virtude dos resultados bioquímicos, exerceu um efeito positivo frente ao prejuízo a memória e aprendizado nos ratos submetidos à sepse, o que não ocorreu nos animais submetidos à sepse com administração de salina. Tais respostas a longo prazo, podem ser em decorrência da proteção precoce contra o estresse oxidativo hipocampal exercido nos animais. Conforme Biff e colaboradores, o estresse oxidativo em tempos precoces como 24 horas após CLP está diretamente correlacionado com o comprometimento cognitivo em longo prazo¹⁰.

Por todos os aspectos levantados, o presente trabalho mostra pela primeira vez o envolvimento da STC-1 na diminuição do estresse oxidativo hipocampal e como resposta em longo prazo diminui o dano a memória em ratos submetidos à sepse.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que a STC-1 exerce um efeito protetor contra o estresse oxidativo hipocampal em ratos submetidos à sepse polimicrobiana 24 horas após a indução da doença. Foi observado a diminuição na concentração de N/N nas três doses de STC-1 quando os animais foram submetidos a sepse. Para o dano em lipídios, não encontramos resultados significativos referentes ao efeito da STC-1, enquanto para o dano as proteínas carboniladas, tivemos uma diminuição na maior dose de STC-1 testada. Para a atividade antioxidante, verificou-se um aumento da SOD superóxido dismutase na maior dose de STC-1 em ratos sépticos. A STC-1 mostrou influenciar, ainda, na melhora do desempenho da memória aversiva dos animais 10 dias após a indução de sepse.

REFERÊNCIAS

1. Steckert AV, de Castro AA, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Sepsis in the central nervous system and antioxidant strategies with N-acetylcysteine, vitamins and statins. *Curr Neurovasc Res*. 2014;11:83–90.
2. Vincent J, Marshall J, Anzueto A, Martin CD, Gomersall C. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA*. 2009;302(21):2323–9.
3. Coopersmith CM, Wunsch H, Fink MP, Linde-Zwirble WT, Olsen KM, Sommers MS, et al. A comparison of critical care research funding and the financial burden of critical illness in the United States. *Crit Care Med*. 2012;40(4):1072–9.
4. Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20(0951–7375):345–52.
5. ILAS-Instituto Latino Americano de Sepse. Campanha sobrevivendo à Sepse - Relatório Nacional. 2014.
6. Janeway CA, Medzhitov R. Innate Immune Recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):197–216.
7. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth*. 2003;90(2):221–32.
8. Comim CM, Barichello T, Grandgirard D, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Leib SL. Caspase-3 mediates in part hippocampal apoptosis in sepsis. *Mol Neurobiol*. 2013;47(1):394–8.
9. Della Giustina A, Goldim MP, Danielski LG, Florentino D, Mathias K, Garbossa L, et al. Alpha-lipoic acid attenuates acute neuroinflammation and long-term cognitive impairment after polymicrobial sepsis. *Neurochem Int*. 2017;108:436–47.
10. Biff D, Petronilho F, Constantino L, Vuolo F, Zamora-Berridi GJ, Dall'Igna DM, et al. Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. *Shock*. 2013;40(1):45–8.
11. Ringer TM, Axer H, Romeike BFM, Zinke J, Brunkhorst F, Witte OW, et al. Neurological Sequelae of Sepsis: I) Septic Encephalopathy. *Open Crit Care Med J*. 2011;4:2–7.
12. Rezende E, Silva JM, Isola AM, Campos EV, Amendola CP, Almeida SL. Epidemiology of severe sepsis in the emergency department and difficulties in the initial assistance. *Clinics (Sao Paulo)*. 2008;63(4):457–64.
13. Widmann CN, Heneka MT. Long-term cerebral consequences of sepsis. *Lancet Neurol*. 2014 Jun;13(6):630–6.
14. Szatmári S, Végh T, Csomós A, Hallay J, Takács I, Molnár C, et al. Impaired cerebrovascular reactivity in sepsis-associated encephalopathy studied by acetazolamide test. *Crit Care*. 2010;14(2):R50.
15. Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D. Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Med*. 2007;33(6):941–50.
16. Pun BT, Thompson JL, Shintani AK, Gordon SM, Canonico AE, Dittus RS, et al. Survivors of Critical Illness. *Crit Care Med*. 2013;38(7):1513–20.
17. Pytel P, Alexander JJ. Pathogenesis of septic encephalopathy. *Curr Opin Neurol*. 2009;22(3):283–7.
18. Zampieri FG, Park M, Machado FS, Azevedo LCP. Sepsis-associated

- encephalopathy: not just delirium. *Clinics*. 2011;66(10):1825–31.
19. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term Cognitive Impairment and Functional Disability Among Survivors of Severe Sepsis. 2010;304(16):1787–94.
20. Semmler A, Widmann CN, Okulla T, Urbach H, Kaiser M, Widman G, et al. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(1):62–9.
21. Götz T, Günther A, Witte OW, Brunkhorst FM, Seidel G, Hamzei F. Long-term sequelae of severe sepsis: cognitive impairment and structural brain alterations - an MRI study (LossCog MRI). *BMC Neurol*. 2014;14(1):145.
22. Tang SE, Wu CP, Wu SY, Peng CK, Perng WC, Kang BH, et al. Stanniocalcin-1 ameliorates lipopolysaccharide-induced pulmonary oxidative stress, inflammation, and apoptosis in mice. *Free Radic Biol Med*. 2014;71:321–31.
23. Huang L, Belousova T, Chen M, DiMattia G, Liu D, Sheikh-Hamad D. Overexpression of stanniocalcin-1 inhibits reactive oxygen species and renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int*. 2012;82(8):867–77.
24. Ma X, Gu L, Li H, Gao Y, Li X, Shen D, et al. Hypoxia-induced overexpression of stanniocalcin-1 is associated with the metastasis of early stage clear cell renal cell carcinoma. *J Transl Med*. 2015;13(1):1–14.
25. Sheikh-Hamad D. Mammalian stanniocalcin-1 activates mitochondrial antioxidant pathways: new paradigms for regulation of macrophages and endothelium. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298(2):F248–54.
26. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA et al. Definitions for sepsis and organ failure and accplscm consensus conference. *Chest*. 1992;101:1644–55.
27. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc*. 2016;315(8):801–10.
28. Warren HS. Strategies for the Treatment of Sepsis. *N Engl J Med*. 1997 Mar 27;336(13):952–3.
29. Prescott HC, Osterholzer JJ, Langa KM, Angus DC, Iwashyna TJ. Late mortality after sepsis: Propensity matched cohort study. *BMJ*. 2016;353:1–8.
30. Young GB. Sparing brain damage in severe sepsis : a beginning. *Crit Care*. 2010;1–2.
31. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;5:4–11.
32. Sharshar T, Carlier R, Bernard F, Guidoux C, Brouland JP, Nardi O et al. Brain lesions in septic shock : a magnetic resonance imaging study. *Intensive Care Med*. 2007;33:798–806.
33. Petronilho F, Périco SR, Vuolo F, Mina F, Constantino L, Comim CM, et al. Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2012;26(6):904–10.
34. Ledderose C, Bao Y, Kondo Y, Fakhari M, Slubowski C, Zhang J, et al. Purinergic Signaling and the Immune Response in Sepsis: A Review. *Clin Ther*. 2016;38(5):1054–65.
35. Ghosh A, Birngruber T, Sattler W, Kroath T, Ratzer M, Sinner F, et al. Assessment of blood-brain barrier function and the neuroinflammatory response in the rat brain by using cerebral Open Flow Microperfusion (cOFM). *PLoS One*. 2014;9(5):3–9.
36. Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*. 2007;170(5):1435–44.

37. Greenhalgh DG. Sepsis in the burn patient: a different problem than sepsis in the general population. *Burn Trauma*. 2017;5(1):23.
38. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth*. 2011;107(1):57–64.
39. Isaac Yang, Seunggu J. Han, Gurvinder Kaur, Courtney Crane and ATP. The Role of Microglia in Central Nervous System Immunity and Glioma Immunology. NIH Public Access. 2010;17(1):6–10.
40. Michels M, Danielski L, Dal-Pizzol F, Petronilho F. Neuroinflammation: Microglial Activation During Sepsis. *Curr Neurovasc Res*. 2014;11(3):262–70.
41. Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, et al. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 2005;33(1):221–3.
42. Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, et al. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Med*. 2008;34(9):1724–31.
43. Chaudhry N, Duggal AK. Review Article Sepsis Associated Encephalopathy. *Adv Med*. 2014;2014:1–16.
44. Sonnevile R, Verdonk F, Rauturier C, Klein IF, Wolff M, Annane D, et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann Intensive Care*. 2013;3(1):1–11.
45. Honig G, Mader S, Chen H, Porat A, Ochani M, Wang P, et al. Blood-brain barrier deterioration and hippocampal gene expression in polymicrobial sepsis: An evaluation of endothelial MyD88 and the vagus nerve. *PLoS One*. 2016;11(1):1–26.
46. Berg RMG, Møller K, Bailey DM. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(7):1532–44.
47. Michels M, Vieira AS, Vuolo F, Zapelini HG, Mendonça B, Mina F, et al. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2015;43:54–9.
48. Kacimi R, Giffard RG, Yenari MA. Endotoxin-activated microglia injure brain derived endothelial cells via NF- κ B, JAK-STAT and JNK stress kinase pathways. *J Inflamm*. 2011;
49. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Jan;7(1):41–53.
50. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):119–45.
51. Shatz CJ. MHC Class I: an unexpected role in neuronal plasticity. NIH Public Access. 2009;64(1):40–5.
52. van Gool WA, van de Beek D, Eikelenboom P. Systemic infection and delirium: when cytokines and acetylcholine collide. *Lancet*. 2010;375(9716):773–5.
53. Henry CJ, Huang Y, Wynne AM, Godbout JP. Peripheral Lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain*. 2010;23(3):309–17.
54. Hannestad J, Gallezot J-D, Schafbauer T, Lim K, Kloczynski T, Morris ED, et al. Endotoxin-induced systemic inflammation activates microglia: [11 C]PBR28 positron emission tomography in nonhuman primates. *Neuroimage*. 2012;63(1):232–9.
55. Imamura Y, Wang H, Matsumoto N, Muroya T, Shimazaki J, Ogura H, et al. Interleukin-1 β causes long-term potentiation deficiency in a mouse model of

- septic encephalopathy. *Neuroscience*. 2011;187:63–9.
56. Cibelli M, Fidalgo AR, Feldmann M, Takata M, Lever IJ, Nanchahal J, et al. Role of Interleukin-1 in Postoperative Cognitive Dysfunction. 2016;68(3):360–8.
 57. Semmler A, Okulla T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Heneka MT. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J Chem Neuroanat*. 2005;30(2–3):144–57.
 58. 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.
 59. Weberpals M, Hermes M, Hermann S, Kummer MP, Terwel D, Semmler A, et al. NOS2 Gene Deficiency Protects from Sepsis-Induced Long-Term Cognitive Deficits. *J Neurosci*. 2009;29(45):14177–84.
 60. Schwalm MT, Pasquali M, Miguel SP, Dos Santos JPA, Vuolo F, Comim CM, et al. Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. *Mol Neurobiol*. 2014;49(1):380–5.
 61. Hasegawa-Ishii S, Inaba M, Umegaki H, Unno K, Wakabayashi K, Shimada A. Endotoxemia-induced cytokine-mediated responses of hippocampal astrocytes transmitted by cells of the brain-immune interface. *Sci Rep*. 2016;6(November 2015):1–16.
 62. Barichello T, Fortunato JJ, Vitali ÂM, Feier G, Reinke A, Moreira JCF, et al. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 2006;34(3):886–9.
 63. Pugh CR, Kumagawa K, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW. Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning. *Brain Behav Immun*. 1998;12(3):212–29.
 64. Parnet P, Amindari S, Wu C, Brunke-Reese D, Goujon E, Weyhenmeyer JA, et al. Expression of type I and type II interleukin-1 receptors in mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;27(1):63–70.
 65. Gemma C, Fister M, Hudson C, Bickford PC. Improvement of memory for context by inhibition of caspase-1 in aged rats. *Eur J Neurosci*. 2005;22(7):1751–6.
 66. Rachal Pugh C, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW. The immune system and memory consolidation: A role for the cytokine IL-1 β . *Neurosci Biobehav Rev*. 2001;25(1):29–41.
 67. Chen J, Buchanan JB, Sparkman NL, Godbout JP, Freund GG, Johnson RW. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *NIH Public Access*. 2008;22(3):301–11.
 68. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(8):629–40.
 69. Krata N, Zagożdżon R, Foronczewicz B, Mucha K. Oxidative Stress in Kidney Diseases: The Cause or the Consequence? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017;0(0):1–10.
 70. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci*. 2016;148:183–93.
 71. Birben E, Murat U, Md S, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO J*. 2012;5(January):9–19.

72. Andrades M, Ritter C, De Oliveira MR, Streck EL, Fonseca Moreira JC, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment reverses organ failure in rat model of sepsis: Role of antioxidant enzymes imbalance, neutrophil infiltration, and oxidative stress. *J Surg Res.* 2011;167(2).
73. Bar-Or D, Carrick MM, Mains CW, Rael LT, Slone D, Brody EN. Sepsis, oxidative stress, and hypoxia: Are there clues to better treatment? *Redox Rep.* 2015;20(5):193–7.
74. Liaudet L, Rosenblatt-Velin N, Pacher P. Role of Peroxynitrite in the Cardiovascular Dysfunction of Septic Shock. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013;11(2):196–207.
75. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging.* 2007;2(2):219–36.
76. Zheng G, Lyu J, Huang J, Xiang D, Xie M, Zeng Q. Experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis: A narrative review. *J Res Med Sci.* 2015 Feb;20(2):185–95.
77. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence.* 2014;5(1):66–72.
78. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89–96.
79. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem.* 2006;97(6):1634–58.
80. Sharshar T, Gray F, De La Grandmaison GL, Hopkinson NS, Ross E, Dorandeu A, et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet.* 2003;362(9398):1799–805.
81. Steckert A V., Comim CM, Mina F, Mendonça BP, Dominguni D, Ferreira GK, et al. Late brain alterations in sepsis-survivor rats. *Synapse.* 2013;67(11):786–93.
82. Chang AC-M, Doherty J, Huschtscha LI, Redvers R, Restall C, Reddel RR, et al. STC1 expression is associated with tumor growth and metastasis in breast cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2015;32(1):15–27.
83. Liu D, Shang H, Liu Y. Stanniocalcin-1 Protects a Mouse Model from Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Affecting ROS-Mediated Multiple Signaling Pathways. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7):1051.
84. Kenichi Ishibashi and Masashi Imai. Prospect of a stanniocalcin endocrine/paracrine system in mammals. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;283:367–75.
85. Wagner GF, Jaworski EWAM, Haddad M, Graham F, Jaworski EM. Stmoannicalcin in the seawater saln : structure , function , and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1998;43(274):1177–85.
86. Lu M, Wagner GF, Renfro JL. Stanniocalcin stimulates phosphate reabsorption by flounder renal proximal tubule in primary culture. *Am J Physiol.* 1994 Nov;267(5):R1356-62.
87. McCudden CR, Kogon MR, DiMattia GE, Wagner GF. Novel expression of the stanniocalcin gene in fish. *J Endocrinol.* 2001;171(1):33–44.
88. Serlachius M. Stanniocalcin-1 in cell stress and differentiation. 2007.
89. Chang ACM, Janosi J, Hulsbeek M, de Jong D, Jeffrey KJ, Noble JR, et al. A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin. *Mol Cell Endocrinol.* 1995;112(2):241–7.
90. Olsen HS, Cepeda MA, Zhang QQ, Rosen CA, Vozzolo BL, Wagner GF.

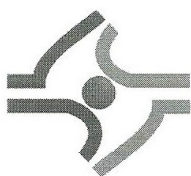
- Human stanniocalcin: a possible hormonal regulator of mineral metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(5):1792–6.
91. De Niu P, Radman DP, Jaworski EM, Deol H, Gentz R, Su J, et al. Development of a human stanniocalcin radioimmunoassay: Serum and tissue hormone levels and pharmacokinetics in the rat. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;162(1–2):131–44.
 92. Deol HK. Dynamic Regulation of Mouse Ovarian Stanniocalcin Expression during Gestation and Lactation. *Endocrinology*. 2000;141(9):3412–21.
 93. Huang L, Garcia G, Lou Y, Zhou Q, Truong LD, DiMattia G, et al. Anti-Inflammatory and renal protective actions of stanniocalcin-1 in a model of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 2009;174(4):1368–78.
 94. James K, Seitelbach M, McCudden CR, Wagner GF. Evidence for stanniocalcin binding activity in mammalian blood and glomerular filtrate. *Kidney Int*. 2005;67(2):477–82.
 95. Groves TC, Wagner GF, DiMattia GE. cAMP signaling can antagonize potent glucocorticoid post-transcriptional inhibition of stanniocalcin gene expression. *J Endocrinol*. 2001;171(3):499–516.
 96. Honda S, Kashiwagi M, Ookata K, Tojo A, Hirose S. Regulation by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ of expression of stanniocalcin messages in the rat kidney and ovary. *FEBS Lett*. 1999;459(1):119–22.
 97. Paciga M, DiMattia GE, Wagner GF. Regulation of luteal cell big stanniocalcin production and secretion. *Endocrinology*. 2004;145(9):4204–12.
 98. Sheikh-Hamad D, Rouse D, Yang Y. Regulation of stanniocalcin in MDCK cells by hypertonicity and extracellular calcium. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2000;278(3):F417–24.
 99. Yeung HY, Lai KP, Chan HY, Mak NK, Wagner GF, Wong CKC. Hypoxia-inducible factor-1-mediated activation of stanniocalcin-1 in human cancer cells. *Endocrinology*. 2005;146(11):4951–60.
 100. Westberg JA, Serlachius M, Lankila P, Penkowa M, Hidalgo J, Andersson LC. Hypoxic preconditioning induces neuroprotective stanniocalcin-1 in brain via IL-6 signaling. *Stroke*. 2007;38(3):1025–30.
 101. Pan JS-C, Huang L, Belousova T, Lu L, Yang Y, Reddel R, et al. Stanniocalcin-1 Inhibits Renal Ischemia/Reperfusion Injury via an AMP-Activated Protein Kinase-Dependent Pathway. *J Am Soc Nephrol*. 2014;26(2):1–15.
 102. McCudden CR, James KA, Hasilo C, Wagner GF. Characterization of Mammalian Stanniocalcin Receptors. *J Biol Chem*. 2002;277(47):45249–58.
 103. McCudden CR, Majewski A, Chakrabarti S, Wagner GF. Co-localization of stanniocalcin-1 ligand and receptor in human breast carcinomas. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;213(2):167–72.
 104. Paciga M, McCudden CR, Londos C, DiMattia GE, Wagner GF. Targeting of big stanniocalcin and its receptor to lipid storage droplets of ovarian steroidogenic cells. *J Biol Chem*. 2003;278(49):49549–54.
 105. Sazonova O, James K a, McCudden CR, Segal D, Talebian A, Wagner GF. Stanniocalcin-1 secretion and receptor regulation in kidney cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294(4):F788–94.
 106. Wang Y, Huang L, Abdelrahim M, Cai Q, Truong A, Bick R, et al. Stanniocalcin-1 suppresses superoxide generation in macrophages through induction of mitochondrial UCP2. *J Leukoc Biol*. 2009;86(4):981–8.
 107. Chen C, Jamaluddin S, Yan S S-HD and YQ. Human Stanniocalcin-1 Blocks

- TNF- α -Induced Monolayer Permeability in Human Coronary Artery Endothelial Cells. NIH Public Access. 2008;28(5):906–12.
108. Lakshmikanth CL, Jacob SP, Chaithra VH, de Castro-Faria-Neto HC, Marathe GK. Sepsis: in search of cure. *Inflamm Res*. 2016;65(8):587–602.
 109. deSa LA. Factors influencing wound infection (a prospective study of 280 cases). *J Postgrad Med*. 1984;30(4):232.
 110. Du Pont-Thibodeau G, Joyal J-S, Lacroix J. Management of neonatal sepsis in term newborns. *F1000Prime Rep*. 2014;6(August):1–8.
 111. Toscano MG, Ganea D, Gamero AM. Cecal ligation puncture procedure. *J Vis Exp*. 2011;(51):1–5.
 112. Nemzek JA, Hugunin KMS, Opp MR. Modeling sepsis in the laboratory: Merging sound science with animal well-being. *Comp Med*. 2008;58(2):120–8.
 113. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol*. 2011;19(4):198–208.
 114. Siempos II, Lam HC, Ding Y, Choi ME, Choi AMK, Ryter SW. Cecal Ligation and Puncture-induced Sepsis as a Model To Study Autophagy in Mice. *J Vis Exp*. 2014;(84):1–7.
 115. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Model organisms: Animal models of sepsis: Setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(10):854–65.
 116. Ohkouchi S, Block GJ, Katsha AM, Kanehira M, Ebina M, Kikuchi T, et al. Mesenchymal Stromal Cells Protect Cancer Cells From ROS-induced Apoptosis and Enhance the Warburg Effect by Secreting STC1. *Mol Ther*. 2012;20(2):417–23.
 117. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res*. 1990;49(2):186–96.
 118. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126(1):131–8.
 119. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186(C):421–31.
 120. Levine BRL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A, et al. Determination of Carbonyl content in oxidatively modified proteins. 1990;186(1983):464–78.
 121. Bannister J V, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987;32:279–312.
 122. Aebi H. Catalase in v itro. *Methods Enzymol*. 1984;105(1947):121–6.
 123. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–75.
 124. Roesler R, Vianna RM. Memory-Enhancing Treatments Do Not Reverse the Impairment of Inhibitory Avoidance Retention Induced by NMDA Receptor Blockade. 1999;258:252–8.
 125. (Concea) CNDCEA/ MDCTEI. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. Brasília. 2013;1–50.
 126. Luan Y-Y, Dong N, Xie M, Xiao X-Z, Yao Y-M. The Significance and Regulatory Mechanisms of Innate Immune Cells in the Development of Sepsis. *J Interf Cytokine Res*. 2014;34(1):2–15.
 127. Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: Time for change. *Lancet*. 2013;381(9868):774–5.
 128. Kratzer E, Tian Y, Sarich N, Wu T, Meliton A, Leff A, et al. Oxidative stress

- contributes to lung injury and barrier dysfunction via microtubule destabilization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47(5):688–97.
129. Dal-Pizzol F, Ritter C, Cassol-Jr OJ, Rezin GT, Petronilho F, Zugno AI et al. Oxidative Mechanisms of Brain Dysfunction During Sepsis. *Neurochem Res*. 2010;35(1):1–12.
 130. Roman Sankowski SM and SIV-F. Systemic Inflammation and the Brain: Novel Roles of Genetic, Molecular, and Environmental Cues as Drivers of Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2015;9(February):1–20.
 131. Copley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 Reasons Why the Brain Is Susceptible To Oxidative Stress. *Redox Biol*. 2018;15(January):490–503.
 132. Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT, Brody EN. Oxidative stress in severe acute illness. *Redox Biol*. 2015;4:340–5.
 133. Kasahara E, Inoue M. Cross-talk between HPA-axis-increased glucocorticoids and mitochondrial stress determines immune responses and clinical manifestations of patients with sepsis. *Redox Rep*. 2015;20(1):1–10.
 134. Lyu J, Zheng G, Chen Z, Wang B, Tao S, Xiang D, et al. Sepsis-induced brain mitochondrial dysfunction is associated with altered mitochondrial Src and PTP1B levels. *Brain Res*. 2015;1620:130–8.
 135. Nissanka N, Moraes CT. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *FEBS Lett*. 2018;592(5):728–42.
 136. Crouser ED. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion*. 2004;4(5–6 SPEC. ISS.):729–41.
 137. Kanellis J, Bick R, Garcia G, Truong L, Tsao CC, Etemadmoghadam D, et al. Stanniocalcin-1, an inhibitor of macrophage chemotaxis and chemokinesis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(2):F356–62.
 138. Chuang YC, Tsai JL, Chang AYW, Chan JYH, Liou CW, Chan SHH. Dysfunction of the mitochondrial respiratory chain in the rostral ventrolateral medulla during experimental endotoxemia in the rat. *J Biomed Sci*. 2002;9(5–6):542–8.
 139. Silvestre F, Danielski LG, Michels M, Florentino D, Vieira A, Souza L, et al. Effects of Organoselenium Compounds on Early and Late Brain Biochemical Alterations in Sepsis-Survivor Rats. *Neurotox Res*. 2014;26(4):382–91.
 140. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003;329(1–2):23–38.
 141. Squire LR, Zola-Morgan S. The medial temporal lobe memory system. *Science*. 1991;253(5026):1380–6.

ANEXO

ANEXO A- Parecer Aprovação da Comissão de Ética



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

Palhoça, 29 de novembro de 2016
Registro na CEUA (código): 16.034.5.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Fabrícia Cardoso Petronilho

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Estudo do efeito neuroprotetor da staniocalcina-1 em sepse polimicrobiana em ratos”, registrada com o nº 16.034.5.01.IV, sob a responsabilidade de Fabrícia Cardoso Petronilho - 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 13/12/2016.

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