



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

A ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3 CONTRIBUI PARA A DISFUNÇÃO
COGNITIVA PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS IDOSOS

Tubarão
2022

SANDRA REGINA SANTANA AGUIAR BONFANTE

**A ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3 CONTRIBUI PARA A DISFUNÇÃO
COGNITIVA PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS IDOSOS**

LINHA DE PESQUISA: Neurociências

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutora em Ciências
da Saúde.

Orientadora: Profa. Fabricia Petronilho, Dra.

Tubarão

2022

- B69 Bonfante, Sandra Regina Santana Aguiar, 1988 -
A ativação do inflamassoma NLRP3 contribui para a disfunção
cognitiva pós-operatória em ratos idosos / Sandra Regina Santana
Aguiar Bonfante. – 2022.
108 f. : il. color. ; 30 cm
- Tese (Doutorado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-
graduação em Ciências da Saúde.
Orientação: Profa. Dra. Fabricia Petronilho
1. Disfunção cognitiva pós-operatória. 2. NLRP3. 3. Estresse
oxidativo. 4. Cadeia respiratória mitocondrial. I. Petronilho, Fabricia
Cardoso. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.
- CDD (21. ed.) 612.8



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - DOUTORADO

Título da Tese

A ativação do inflamassoma NLRP3 contribui para a disfunção cognitiva pós-operatória em ratos idosos

SANDRA REGINA SANTANA DE AGUIAR BONFANTE
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 10 de fevereiro de 2022.

Doutora Fabricia Cardoso Petronilho (Orientador) 
Doutora Mariana Pereira de Souza Goldim (Avaliador externo - UNIBAVE) – presente por videoconferência
Doutora Talita Tuon (Avaliador externo - UNIVILLE) – presente por videoconferência
Doutora Josiane Somariva Prophiro (Avaliador interno – PPGCS) – presente por videoconferência
Doutor Rafael Mariano de Bitencourt (Avaliador interno - PPGCS) – presente por videoconferência



Professor Doutor Jefferson Luiz Traebert
COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

- **Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina, Sede, Reitoria** - Av. José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
- **Unisul Região Sul**
 - **Campus Tubarão** - Avenida José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon, Caixa Postal 370 - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
 - **Campus Araranguá** - Rodovia Governador Jorge Lacerda, 3201, Bairro Urussanguinha - 88905-355, Araranguá, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3521-3000
 - **Campus Braço do Norte** - Rodovia SC 370, 1023, Rio Bonito - 88750-000, Braço do Norte, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3925
 - **Campus Içara** - Rua Linha Três Ribeirões, Loteamento Centenário, 250, Bairro Liri - 88820-000, Içara, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3460
- **Unisul Região Grande Florianópolis**
 - **Campus Pedra Branca** - Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária Pedra Branca, 88137-270, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1000
 - **Campus Florianópolis** - Rua Dib Mussi, 366, Centro - 88015-110, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
 - Rua Trajano, 219, Centro - 88010-010, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
- **Campus Unisul Digital** - Av. Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - 88137-900, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1200

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado essa oportunidade e por todas as coisas boas que tive na minha trajetória do doutorado que apesar das dificuldades foi muito gratificante. A toda minha família, pelo o apoio e a paciência por todos esses anos.

Agradecer a minha orientadora Dra. Fabricia Petronilho, uma pessoa com um conhecimento e caráter inigualável. Por toda paciência, orientação, dedicação, carinho e ajuda que só um verdadeiro mestre pode oferecer.

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

A toda incrível equipe do Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos – Neuroimet da UNISUL, que sem eles nada disso seria possível e ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, o qual proveu os meios necessários para a conclusão do doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos vocês, gratidão!

“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).

RESUMO

Introdução: Pacientes idosos submetidos a procedimentos cirúrgico, como cirurgia ortopédica, frequentemente desenvolvem Disfunção Cognitiva Pós-operatória (DCPO). A DCPO refere-se a distúrbios que afetam a orientação, atenção, percepção e consciência. Os mecanismos propostos são multifatoriais. Recentemente, receptores que formam complexos proteicos, chamados inflamassomas foram identificados. Nesse sentido o inflamassoma NLRP3 pode estar envolvido com a exacerbação da resposta inflamatória após o procedimento cirúrgico ortopédico.

Objetivo: Investigar o envolvimento da ativação de NLRP3 nos mecanismos associados à DCPO de ratos idosos comparados a jovens em um modelo experimental de fratura da tíbia (FT).

Métodos: Ratos *Wistar* machos adultos e idosos, foram submetidos ao modelo de FT. Após a FT os animais receberam salina ou inibidor de formação de inflamassoma NLRP3 (MCC950, 140 ng/kg) via intracerebroventricular. Após sete dias, os grupos controle (sham) e FT tratados com MCC950 ou salina, foram submetidos a avaliação da função cognitiva por meio do teste de reconhecimento de objetos, sobrevivência, atividade de mieloperoxidase, concentração de nitrito/nitrato (N/N); dano oxidativo a lipídios e proteínas; a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase-SOD e catalase-CAT), enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e a atividade da succinato desidrogenase (SDH) no hipocampo e córtex pré-frontal.

Resutados: MCC950 restaurou o comprometimento da memória, elevação de N/N e peroxidação lipídica no hipocampo e córtex pré-frontal, bem como preservou a atividade de CAT no córtex pré-frontal em ratos idosos. Adicionalmente na mesma idade reverteu a alteração da atividade do complexo I em ambas as regiões cerebrais e II, IV e SDH no córtex pré-frontal.

Conclusão: A ativação de NLRP3 está associada ao comprometimento da memória de longo prazo, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial em ratos idosos submetidos a um modelo experimental de FT.

Descritores: Disfunção cognitiva pós-operatória, NLRP3, Estresse oxidativo, Cadeia respiratória mitocondrial.

ABSTRACT

Introduction: Elderly patients undergoing surgical procedures, such as orthopedic surgery, develop Postoperative Cognitive Dysfunction (POCD). POCD refers to disturb affecting orientation, attention, perception, and consciousness. The proposed mechanisms are multifactorial. Recently, receptors that form protein complexes, called inflammasomes have been identified. This sense the NLRP3 inflammasome may be involved with the exacerbation of the inflammatory response after orthopedic surgical procedure.

Objective: To investigate the involvement of NLRP3 activation in the mechanisms underlying POCD in aged compared to young rats in an experimental tibial fracture model (TF).

Methods: Aged, adult male Wistar rats were subjected to the TF model. After TF the animals received saline or NLRP3 inflammasome formation inhibitor (MCC950, 140 ng/kg) via intracerebroventricular. After seven days, the control (sham) and FT groups treated with MCC950 or saline, underwent assessment of cognitive function by object recognition test, survival, myeloperoxidase activity, nitrite/nitrate (N/N) concentration; oxidative damage to lipids and proteins; the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase-SOD and catalase-CAT), mitochondrial respiratory chain enzymes and the activity of succinate dehydrogenase (SDH) in hippocampus and prefrontal cortex.

Results: MCC950 restored memory impairment, N/N elevation and lipid peroxidation in hippocampus and prefrontal cortex, as well as preserved CAT activity in prefrontal cortex in aged rats. Additionally at the same age it reversed the altered complex I activity in both brain regions and II, IV and SDH activity in prefrontal cortex.

Conclusion: NLRP3 activation is associated with impaired long-term memory, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aged rats submitted to an experimental model of TF.

Keywords: Postoperative cognitive dysfunction, NLRP3, Oxidative stress, Mitochondrial respiratory chain.

LISTAS

Lista de siglas e abreviaturas

ANOVA – Análise de variância

ASC – Proteínas semelhantes a partícula apoptótica contendo domínio de recrutamento de caspase (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain*)

ATP – Adenosina trifosfato

BHE – Barreira Hematoencefálica

CAT – Catalase

CEUA – Comissão de Ética em Uso de Animais

DAMPs – Padrões moleculares associados ao dano (*Damage-associated molecular patterns*)

DCIP – 2,6-dicloroindofenol

DCPO – Disfunção Cognitiva Pós-Operatória

EAE – Encefalomielite autoimune experimental

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

i.p. – intraperitoneal

icv – intracerebroventricular

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

K⁺ – Potássio

MDA – Malonaldeído

MMP – Metaloproteinases de matriz extracelular (*Matrix metalloproteinase*)

MPO – Mieloperoxidase

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NF- κ B – Fator Nuclear kappa B (*Nuclear Factor kappa B*)

NLRs – Receptores do tipo domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (*Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*)

NLRP3 – Domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos contendo domínios ricos em leucina e domínio pirina tipo 3 (*NLR family pyrin domain containing 3*)

N₂O – Óxido nitroso

NO₂⁻ – Dióxido de nitrogênio

NOD – Domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (*Nucleotide oligomerization domain*)

O₂⁻ – Ânion superóxido

OH[•] – Radical hidroxil

ON – Óxido nítrico

ONOO⁻ – Peroxinitrito

P2X7 – Receptor purinérgico P2X7

PAMP's – Padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular pattern*)

RRPs - Receptores de Reconhecimento Padrão (*Pattern Recognition Receptors*)

SOD – Superóxido Dismutase

SNC – Sistema Nervoso Central

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TLRs – Receptores *Toll-like* (*Toll-like Receptors*)

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

EUA – Estados Unidos da América

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

Lista de figuras

Figura 1 – Resposta neuroinflamatória ao trauma pós-operatório.	17
Figura 2 – Formação de espécies reativas e as enzimas antioxidantes.	23
Figura 3 – Esquema da estrutura do complexo inflamassoma NLRP3.	26
Figura 4 – Ilustração esquemática da ativação do inflamassoma NLRP3.....	27
Figura 5 – Esquema representativo do experimento.....	31
Figura 6 - Etapas do modelo experimental de fratura na tíbia.....	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
1.1.1 Definição e epidemiologia da DCPO.....	15
1.1.2 Fisiopatologia da DCPO	16
1.1.2.1 Inflamação Periférica a Neuroinflamação	16
1.1.3 Estresse Oxidativo e Disfunção energética mitocondrial.....	21
1.1.4 Receptores do tipo NOD e formação do inflamassoma NLRP3	25
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MÉTODOS.....	30
3.1 TIPO DE ESTUDO	30
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	30
3.3 ANIMAIS.....	30
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	31
3.4.1 Desenho experimental	31
3.4.2 Modelo de fratura de tíbia.....	32
3.5 ANÁLISES.....	33
3.5.1 Coleta das amostras	33
3.5.2 Análise da Sobrevida	33
3.5.3 Reconhecimento de objetos.....	33
3.5.4 Avaliação da atividade da mieloperoxidase.....	35
3.5.5 Determinação de nitrito/nitrato	35
3.5.6 Avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	35
3.5.7 Avaliação de carbonilação protéica	35
3.5.8 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes.....	36
3.5.9 Atividade da enzima succinato desidrogenase	37
3.5.10 Atividade da cadeia respiratória mitocondrial.....	37
3.5.11 Determinação de proteínas totais	38
3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	38
3.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	39

4. ARTIGO	40
APÊNDICE - Normas da revista para submissão do artigo da tese	41
ANEXO A - Parecer Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	42
ANEXO B - Produção científica publicada durante o período do doutorado	43

1. INTRODUÇÃO

A disfunção cognitiva pós-operatória (DCPO) é definida por um declínio no desempenho cognitivo avaliado por testes neuropsicológicos antes e após um procedimento cirúrgico e a exposição à anestesia¹. A complicação da DCPO está associada com o aumento da morbidade e mortalidade, principalmente em pacientes idosos². Há muitas controvérsias em relação à DCPO desde o seu diagnóstico até as reais implicações para o paciente, e sua alta incidência é encontrada principalmente após procedimentos cardíacos e ortopédicos^{2,3}.

A população mundial está envelhecendo e o número de idosos submetidos à procedimentos cirúrgicos aumentam constantemente⁴. Mundialmente, estima-se que 50% de todos os idosos sejam submetidos a pelo menos um procedimento cirúrgico e a DCPO é a uma das complicações mais comuns e pouco compreendida⁵.

A DCPO pode ser detectada dias a semanas após o procedimento cirúrgico, podendo se tornar permanente^{5,6}. Dessa forma, os idosos estão mais propensos para desenvolver a DCPO, que inclui perda de memória, concentração ou comprometimento da atenção, alterações estas associadas com o aumento da mortalidade^{5,7}.

O próprio processo natural de envelhecimento acarreta em alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas no sistema nervoso central (SNC), com prejuízo de suas funções⁸. Devido a estas alterações, há uma redução da capacidade do idoso para lidar com o estresse associado à cirurgia, anestesia e internação³.

Dados conclusivos sobre a etiologia da DCPO ainda não foram determinados. Entretanto, sabe-se que os procedimentos cirúrgicos causam uma resposta de estresse sistêmico, o que leva à liberação de hormônios neuroendócrinos e uma resposta inflamatória⁹. Estudos pré-clínicos indicam que mecanismos, incluindo as vias humoral, celular e neural, possuem relação com a comunicação bidirecional entre o sistema imunitário e o cérebro após a cirurgia. O envolvimento da resposta neuroinflamatória com comprometimento da barreira hematoencefálica (BHE), consequentemente provoca estresse oxidativo e disfunção mitocondrial ocasionando dano cerebral¹⁰⁻¹⁵.

Tendo por base que a resposta inflamatória seria o ponto inicial da DCPO, todo o sistema imune inato, composto por células efetoras como macrófagos, neutrófilos e

células dendríticas, estaria envolvido na fisiopatologia dessa disfunção. Essas células possuem receptores expressos em sua superfície chamados de receptores de reconhecimento padrão (RRPs; do inglês, *Pattern Recognition Receptors*), que são capazes de reconhecer estruturas moleculares presentes em microorganismo ou após a lesão celular^{16,17}.

Alguns receptores do tipo Toll-like (TLRs; do inglês, *Toll Like Receptors*) assim como os receptores do tipo domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (NOD; do inglês, *nucleotide binding and oligomerization domain*) conhecidos por formarem inflamassomas, encontram-se no citoplasma de diferentes células imunes e ambos atuam como RRP^{18,19}. A ativação destes receptores gera respostas imunes importantes para a defesa do hospedeiro e reparo tecidual¹⁹.

Nesse espectro, o inflamassoma é um complexo que contém receptores do tipo NOD ou também chamados NLRs (do inglês, *NOD-like receptors*) que além de reconhecerem os padrões moleculares associados ao patógenos (PAMPs; do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*), reconhecem padrões moleculares associados a danos (DAMPs; do inglês, *damage-associated molecular patterns*)¹⁶. A ativação destes receptores é crucial para a ativação de respostas inflamatórias durante o dano, como já verificado em processos como a isquemia e a sepse²⁰.

Dentre os NLRs, existem vários membros (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRC4, NLRP6, NLRP7 e NLRP12) capazes de formar inúmeros complexos de inflamassomas²¹. No entanto, o NLRP3 é o receptor mais bem descrito desta família²². Trata-se de um complexo proteico citosólico estruturalmente composto pela molécula NLRP3, uma proteína adaptadora, proteínas semelhantes a partícula apoptótica contendo domínio de recrutamento de caspase (ASC do inglês, *Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain*) com domínio N-terminal e pela pró-caspase-1²³.

Alguns estudos sugerem que a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) levam à ativação do inflamassoma NLRP3 e, portanto, as EROs exercem um efeito sobre a ativação da resposta inflamatória^{24,25}. Nesse sentido, mesmo que o inflamassoma NLRP3 possua um papel importante na regulação da imunidade inata²⁶, em contrapartida, sabe-se do seu envolvimento sobre a resposta inflamatória desregulada e a sua associação a gênese de doenças inflamatórias²⁶.

Portanto, sabendo que a fisiopatologia da DCPO esta associada ao estresse oxidativo¹⁵ e à neuroinflamação persistente²⁷, tem-se como hipótese no presente

estudo que a ativação da via regulada pelo inflamassoma NLRP3 possua influência sobre tais alterações cerebrais associadas à DCPO. Dessa forma com o presente estudo, pretendeu-se responder a hipótese proposta trazendo novas perspectivas mecânicas da fisiopatologia da DCPO como pela via regulada pelo NLRP3.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Definição e epidemiologia da DCPO

A DCPO é uma complicação grave na função cognitiva após procedimentos cirúrgicos²⁸. Refere-se a uma deterioração da função intelectual associada à cirurgia, comprometendo o processamento de informações, incluindo tarefas mentais como: atenção, raciocínio e memória, impedindo o indivíduo de adquirir conhecimento e solucionar problemas, quantificados por testes neuropsicológicos²⁹. Em casos mais graves, apresenta confusão, alucinações e delírios³⁰.

Idealmente, os testes de avaliação neurofuncional devem ser realizados antes e após um procedimento cirúrgico e exposição a anestesia^{29,31}. Além disso, os pacientes com disfunção cognitiva anterior a DCPO parecem ter um risco maior de morte a longo prazo, realocações hospitalares, comprometimento cognitivo até cinco anos após a cirurgia, gerando um impacto na qualidade de vida^{32,33}. Ainda, a hospitalização como extensão da cirurgia e resposta inflamatória sistêmica podem contribuir para a DCPO³.

De fato, uma cirurgia pode levar ao declínio cognitivo transitório em pacientes de todas as faixas etárias, mas a persistência da DCPO é observada principalmente em pacientes idosos²⁷. Aproximadamente cerca de 30% da população idosa em países desenvolvidos é exposta a um episódio de anestesia anualmente e a prevalência de transtornos neurocognitivos em pacientes com mais de 65 anos varia entre 20% e 34%³⁴.

Além disso, a incidência relatada de disfunção cognitiva em idosos é de aproximadamente 6,8% após cirurgias menores, e aproximadamente 10% dos idosos submetidos à cirurgia irão desenvolver DCPO, aumentando à medida que os pacientes idosos necessitem de novos procedimentos cirúrgicos³⁵. A DCPO está relacionada com uma alta incidência após um procedimento cirúrgico ortopédico^{3,36}.

Dentro de alguns grupos de alto risco, como pacientes com fratura de quadril, varia de 16 a 62%³⁷⁻³⁹.

A cirurgia ortopédica é realizada rotineiramente, especialmente em idosos, para melhorar a qualidade de vida e reparar lesões ósseas comuns^{40,41}. No entanto, até 50% dos pacientes de cirurgia ortopédica com mais de 65 anos de idade apresentam comprometimentos neurológicos por cirurgia e anestesia geral, levando a um declínio cognitivo persistente^{40,41}. Além disso, a capacidade de curar e regenerar tecidos após a cirurgia diminui com a idade e pode afetar a qualidade do reparo da fratura e até a integração óssea dos implantes⁴⁰. Isso se correlaciona com um mal prognóstico, ou seja, aumenta o risco de mortalidade nos primeiros meses, declínio funcional persistente e aumento do tempo de internação hospitalar⁴²⁻⁴⁴.

Alguns fatores de risco são sugeridos na gênese da DCPO em relação às cirurgias ortopédicas, incluindo idade avançada, complicações tromboembólicas, influência da terapia medicamentosa para dor no período pós-operatório e imobilização prolongada resultante de fraturas dos ossos longos^{40,45}. Estudos mostram que a DCPO está associada a uma resposta inflamatória sistêmica à cirurgia^{34,46-48}, que também tem sido descrita em cirurgias ortopédicas, como artroplastia^{6,41}.

Ademais, pesquisas indicam que a neuroinflamação e o estresse oxidativo são mecanismos determinantes para o desenvolvimento da DCPO em pacientes idosos concentrando-se principalmente sobre o comprometimento do hipocampo^{27,49}. Após a cirurgia, a disfunção endotelial, a ruptura da BHE e a infiltração periférica de macrófagos, contribuem para a neuroinflamação aguda do hipocampo^{11,50}. Entretanto, apesar dos fatores identificados, ainda não existem evidências suficientes sobre os mecanismos responsáveis pela DCPO em idosos⁴⁰.

1.1.2 Fisiopatologia da DCPO

1.1.2.1 Inflamação Periférica a Neuroinflamação

A neuroinflamação, processos de estresse oxidativo, hipóxia cerebral, neurotoxicidade, alterações da neurotransmissão colinérgica e alteração da permeabilidade da BHE, estão envolvidos na fisiopatologia da DCPO^{2,11,12,51-53}. Entretanto, apesar de mecanismos fisiopatológicos da DCPO terem sido descritos, é

importante elucidar a perpetuação da resposta neuroinflamatória particularmente associada a mecanismos de neurodegeneração⁵⁴.

Está bem descrito que após uma cirurgia ortopédica como da fratura na tíbia, ocorre inflamação sistêmica e central^{11,51,55–57}. De fato, o dano tecidual e o trauma decorrente da cirurgia induzem à formação de DAMPs conhecidos como alarminas, a exemplo a proteína caixa 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1; do inglês, *high mobility group box 1*)⁵⁸. A ligação de DAMPs – RRP envolve células do sistema imune inato como monócitos-macrófagos conduzindo à ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias que são rapidamente elevadas após a cirurgia ortopédica, tanto em camundongos quanto em seres humanos^{51,59,60} (Figura 1).

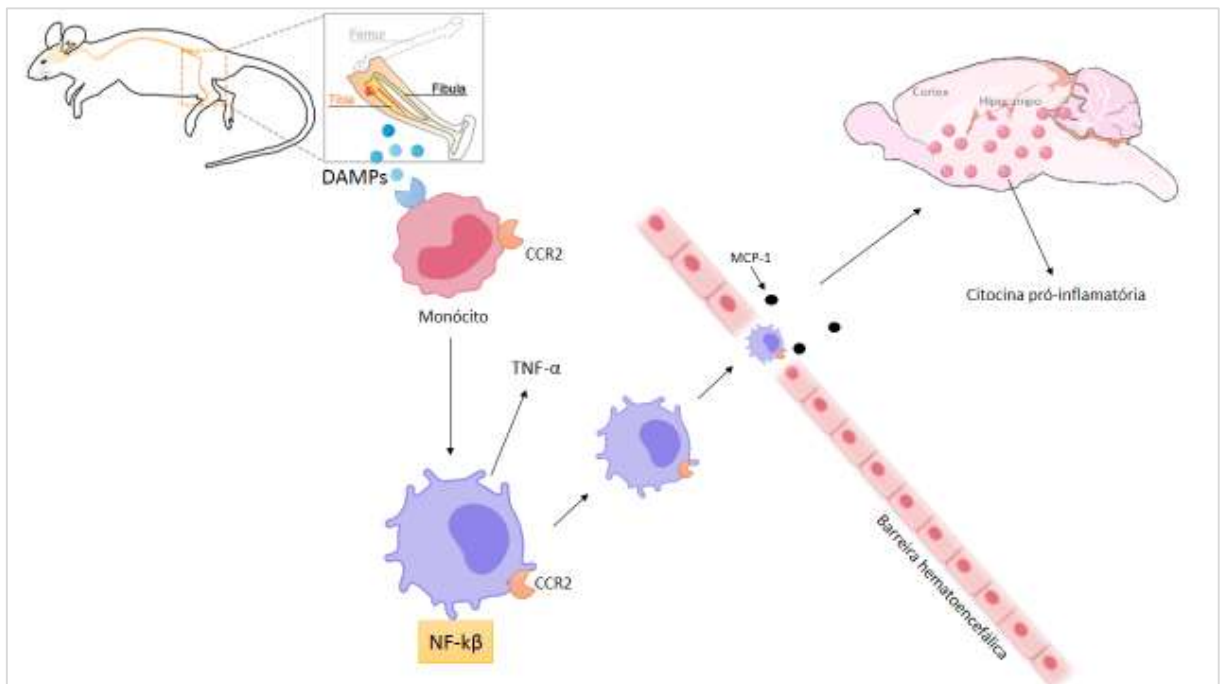


Figura 1 – Resposta neuroinflamatória ao trauma pós-operatório.

Fonte: Adaptado de Su e colaboradores⁵².

O aumento da expressão de citocinas no hipocampo de camundongos após um procedimento cirúrgico foi associado ao declínio cognitivo corroborando a visão de que a neuroinflamação induzida pela cirurgia pode resultar no comprometimento cognitivo⁶¹. A neuroinflamação é um componente crítico dos mecanismos patogênicos da DCPO, pois o trauma cirúrgico induz a ligação DAMPs a RRP; envolvendo o sistema imunológico inato via sinalização dependente de NF- κ B nos monócitos, para

sintetizar e liberar citocinas pró-inflamatórias, incluindo o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α ; do inglês, *Tumor Necrosis Factor Alpha*), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), e interleucina-18 (IL-18)^{11,62–66} no qual estão completamente implicadas na resposta inflamatória⁶⁷.

O pico da resposta inflamatória após um trauma ortopédico, inicia dentro das primeiras 24 horas⁶⁸. As concentrações de TNF- α no sangue apresentam pico nas primeiras 24 horas e retorna aos valores basais dentre as 72 horas pós trauma⁶¹. O TNF- α é expresso por macrófagos e outras células inflamatórias e induz uma cascata inflamatória e age como agente quimiotático recrutando fibroblastos e células osteoprogenitoras⁶⁹. Já a IL-1 β é produzida por macrófagos na fase aguda da inflamação, induz a produção de IL-6 nos osteoblastos, produz o calo cartilaginoso primário e também promove angiogênese no tecido ósseo lesionado⁷⁰.

Logo, a inflamação é um processo biológico fundamental para a erradicação dos agentes patogênicos e a manutenção da homeostase dos tecidos⁷¹. No entanto, se esta progressão de eventos persiste, o processo pode progredir para um estado de inflamação crônica com respostas sistêmicas⁷². Nesse contexto, a liberação de citocinas pró-inflamatórias periféricas tem papel importante na ruptura da BHE, seja por ativação endotelial direta ou relacionada à capacidade que as mesmas têm de elevar a expressão de metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs; do inglês, *matrix metalloproteinase*), enzimas da classe das proteases zinco-dependentes que alteram a ligação entre as junções apertadas da BHE⁵⁸.

Ademais, os mediadores inflamatórios periféricos além de alterar a permeabilidade da BHE, podem causar ativação do SNC através do nervo vago o qual se comunica diretamente com as estruturas encefálicas^{70,73–75}. A BHE é fundamental para a homeostase, manutenção e função da sinalização neuronal adequada⁷⁶. Além das funções de permeabilidade seletiva, a BHE possui aspectos importantes como função neuroimune, incluindo a secreção de citocinas, protaglandinas e óxido nítrico⁷⁷.

Achados clínicos e experimentais mostram que a disfunção da BHE é uma marca inicial para vários distúrbios neurológicos, a exemplo a DCPO⁷⁸. Essas alterações são geradas quando ocorre sinalização imune por meio da ativação das células endoteliais que compõem a BHE via citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez, pode causar o aumento da permeabilidade, aumentando a infiltração de substâncias tóxicas dos tecidos periféricos para o encéfalo^{76,78}. Portanto, com o rompimento da BHE, substâncias neurotóxicas, assim como mediadores inflamatórios

periféricos, têm acesso livre para o parênquima cerebral, migrando para regiões do encéfalo, causando danos neuronais, por ativação excessiva de micróglia e astrócitos^{57,79,80}.

Quando em repouso, as micróglia realizam manutenção de rotina e vigilância imunológica⁸¹. Em resposta a uma lesão ou por um estímulo imune, a micróglia pode iniciar uma resposta neuroinflamatória, podendo secretar uma variedade de moléculas pró-inflamatórias, como óxido nítrico, espécies reativas e citocinas como TNF- α e IL-1 β , e possíveis moléculas de adesão celular⁸¹⁻⁸⁴.

A resposta neuroinflamatória causada pela ativação microglial é crucial para a recuperação do SNC. Porém, quando há persistência extracelular anormal, a resposta inflamatória adquire um caráter nocivo, tendo em vista que estimula danos secundários aos neurônios e exacerba a ocorrência de muitos distúrbios como lesões estruturais, morte celular e disfunção neurológica^{81,85}. Ademais, este processo prejudica a BHE, o que oportuna a recorrente ocorrência de dano ao sistema nervoso e disfunção deste órgão⁸⁶. No hipocampo se sabe que a micróglia ativada libera citocinas pró-inflamatórias capazes de interromper a potencialização a longo prazo, o correlato neurobiológico de aprendizado e memória⁸⁷.

Nesse sentido, sabe-se que o trauma cirúrgico em modelos animais está associado com a ativação microglial persistente capaz de manter níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β ⁵³. O aumento das citocinas inflamatórias a nível cerebral leva à apoptose celular provocando o aumento dos níveis da proteína S100 β , que é um marcador de lesão aguda cerebral⁸⁸. Em um estudo conduzido por Li e colaboradores em 2012, encontraram uma associação entre o desenvolvimento de DCPO e os níveis elevados de S100 β , TNF- α e IL-6⁸⁹. A IL-6 é reguladora importante de sinapses, cujas concentrações locais elevadas podem inibir a função sináptica⁹⁰.

Em um modelo pré-clínico, foi demonstrado o envolvimento de IL-1 β e TNF- α na mediação da neuroinflamação via ativação microglial, com subsequente comprometimento cognitivo¹¹. Ainda, Terrando e colaboradores⁵¹ mostraram que o tratamento com anticorpo anti-TNF- α foi efetivo em diminuir a cascata de citocinas no hipocampo, assim como o declínio cognitivo após fratura de tíbia em modelo animal⁵¹.

Particularmente o declínio cognitivo após a cirurgia em idosos é um grande problema clínico de mecanismo incerto⁵¹. No entanto, à medida que a população envelhece, a cirurgia está sendo realizada com maior frequência em pacientes

progressivamente mais velhos e com maior prevalência de comorbidades⁹¹. Estudos mostram que em idosos, a perpetuação do processo inflamatório pode apresentar uma disfuncionalidade comparado a indivíduos jovens^{6,9,41}. O processo de envelhecimento é acompanhado do aumento na fragilidade física e mental produzindo um risco elevado de estresse físico e psicológico⁹². O estresse é um potente modulador da função imune, que na juventude pode ser compensado pela presença de uma resposta imune adequada⁹². Assim, em idosos a resposta imune é atenuada como resultado do declínio de vários componentes do sistema imunológico⁹². Além disso, ao envelhecer, a capacidade de reparo e regeneração de tecidos também diminui, apresentando uma mudança para um estado pró-inflamatório crônico conhecido como *inflammaging*⁹².

Associado à imunodeficiência característica em idosos, as células da micróglia são ativadas por processos neurodegenerativos crônicos⁹³. Dessa forma, a interação da inflamação sistêmica com as alterações degenerativas preexistentes pode ser um importante mecanismo para explicar muitos episódios de delirium⁹⁴. Com o envelhecimento, há ainda uma redução fisiológica de 28% no fluxo sanguíneo cerebral, além de perda neuronal em muitas áreas, incluindo o neocórtex e o hipocampo⁹⁵.

Segundo Price e colaboradores⁹⁶, marcadores neuroimagiológicos, como o volume do hipocampo, podem indicar o risco de DCPO pré-operatoriamente, sabendo-se que o hipocampo é vulnerável à degeneração neuronal após estresse biológico ou psicológico severo. Estudos afirmam que o grau de atrofia do hipocampo é um indicador das alterações cerebrais neurodegenerativas^{97,98}. Chen e colaboradores conduziram um estudo que avaliou a redução do volume do hipocampo em doentes idosos com DCPO⁹⁹. Este estudo mostrou que o volume do hipocampo é menor nos doentes com DCPO comparativamente aos sem DCPO, sugerindo que o volume do hipocampo possa ser um fator independente para prever a ocorrência de DCPO nos doentes idosos⁹⁹.

Mesmo com todos os aspectos mencionados, como a neuroinflamação associada à neurodegeneração e a susceptibilidade de regiões cerebrais alvo, particularmente em idosos para o desenvolvimento da DCPO, ainda podemos destacar o envolvimento do estresse oxidativo e disfunção mitocondrial⁹¹. A alteração dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e a neuroinflamação são fontes de produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) em nível cerebral com

comprometimento da função celular pelo dano em lipídios, proteínas e DNA, sendo um evento adicional e determinante para a DCPO em idosos após cirurgia ortopédica⁴⁹.

1.1.3 Estresse Oxidativo e Disfunção energética mitocondrial

Radicais livres são moléculas que tem alta instabilidade química, e elétrons desemparelhados na última camada eletrônica¹⁰⁰. No entanto, existem outras moléculas químicas reativas que podem se comportar como radicais livres mesmo não tendo elétrons desemparelhados na sua última camada¹⁰¹. Dessa forma, todas essas moléculas são chamadas de espécies reativas¹⁰¹. Estas espécies podem ser geradas a partir do oxigênio molecular ou do nitrogênio¹⁰².

No ser humano, as principais fontes geradoras de EROs são as reações que utilizam oxigênio ou nitrogênio¹⁰². As mitocôndrias representam a maior fonte endógena de produção de EROs nos eucariontes, onde uma pequena parte do oxigênio utilizado na respiração celular pode se transformar em espécies reativas¹⁰³. No entanto, as células imunes, como a própria microglia, macrófagos e neutrófilos, que apresentam as enzimas NADPH oxidase, são capazes de produzir elevadas concentrações destes metabólitos que atuam como microbicidas, protegendo o organismo contra o ataque de patógenos^{103,104}.

Por outro lado, para que os níveis de EROs não excedam o necessário para o controle do microrganismo, as células dispõe de mecanismos enzimáticos antioxidantes, exercendo um controle sobre as espécies reativas geradas, evitando o dano celular¹⁰⁵. Entretanto, quando a produção de espécies reativas é exacerbada ou a concentração ou atividade das enzimas antioxidantes é prejudicada, ocorre um fenômeno chamado estresse oxidativo, podendo então acarretar danos celulares^{106,107}. Estes danos são oxidação de lipídios e proteínas, as quais sofrem modificações estruturais e funcionais. E por fim, o dano pode propagar-se até o núcleo celular, danificando o DNA e dificultando os mecanismos de reparação do organismo¹⁰⁸. Tais respostas, estão associados como eixo na fisiopatologia de diferentes doenças neurodegenerativas^{106,107}.

No que refere-se a formação de EROs pelas mitocôndrias, tal organela responsável pela respiração celular e síntese de ATP, também participam da homeostase de cálcio, síntese de esteróides e também pela geração de radicais livres,

sendo essencial na manutenção da estrutura e função celular^{109,110}. O processo de geração de ATP se inicia no citoplasma com as enzimas da via glicolítica, através do catabolismo da glicose a piruvato, que entra na matriz mitocondrial, gerando as coenzimas reduzidas NADH e FADH₂¹⁰⁹. Por sua vez, as coenzimas reduzidas são oxidadas nos complexos localizados nos poros mitocondriais, e os elétrons são transportados pelos complexos I, II, III e IV e ubiquinona, até chegarem aoceptor final oxigênio (O₂), reduzindo-o a água e formando a ATP¹¹¹.

Entretanto, apenas uma pequena concentração de O₂ é convertida a ERO na mitocôndria em condições de homeostase, todavia sua produção é aumentada na presença de hipóxia ou isquemia, lesão tecidual, infecção, inflamação e trauma cirúrgico¹¹², o que pode se elevar o potencial oxidante das EROs. Particularmente, em tecidos onde ocorre uma fratura, devido ao mecanismo de isquemia, reperfusão e resposta inflamatória, existe um aumento de geração de EROs com disfunção mitocondrial¹¹³. A disfunção mitocondrial participa desse processo através de vias que podem levar à morte celular por apoptose ou necrose¹¹⁰.

As EROs são representadas por radicais livres e não-livres, moléculas de radicais oxigenados, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânion superóxido (O₂⁻), e o radical hidroxil (OH⁻)^{114,115}. Na mitocôndria por exemplo, a formação de EROs ocorre nos complexos da cadeia respiratória especialmente nos complexos I, II e III, onde o oxigênio é convertido ao O₂⁻, tendo alto poder oxidativo¹⁰³.

Para manter a homeostase orgânica, ou balanço redox, as células dispõe de um sistema de defesa antioxidante: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx), sendo que antioxidante é definido como qualquer substância que, mesmo presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, pode adiar ou prevenir a oxidação do mesmo ou de forma significativa¹¹⁶. O O₂⁻ ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos e como visto, no funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial¹¹⁷. Imediatamente após a sua geração ele é catalizado pela enzima SOD, sendo convertido em H₂O₂, permitindo que as demais enzimas do complexo possam fazer posterior transformação à água.

O H₂O₂ apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados, é uma molécula altamente reativa e tóxica, nesse momento a enzima CAT entra em ação e converte o H₂O₂ em oxigênio molecular e água¹¹⁸. Porém, caso a atividade da enzima não seja suficiente, o H₂O₂ pode reagir com o ferro

(Fe^{2+}), e formar um radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$). O $\text{OH}^\cdot$ é o mais reativo em sistemas biológicos e com maior capacidade de causar dano tecidual, pois não existe mecanismo de eliminação enzimático específico para ele¹¹⁹. Ademais, assim como a CAT a GPx que possui atividade de peroxidase, ou seja, catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a oxigênio e água¹²⁰ (Figura 2).

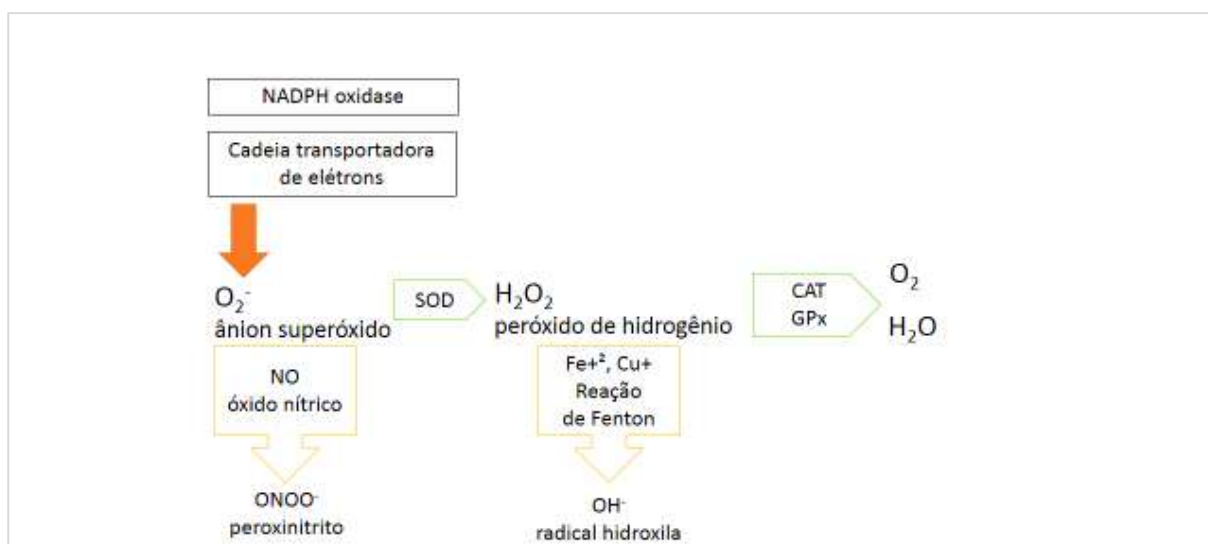


Figura 2 – Formação de espécies reativas e as enzimas antioxidantes.

Fonte: Adaptado de Su e colaboradores¹²¹.

Além das EROs, existem também aquelas originadas a partir da oxidação do nitrogênio, as espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Dentre elas, o óxido nítrico (NO) e dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^\cdot$) apresentam elétrons desemparelhados, portanto, podem ser considerados como radicais livres, diferentemente do óxido nitroso (N_2O)¹²². O óxido nítrico endógeno, sintetizado a partir de L-arginina, de oxigênio e de NADPH oxidase, por enzimas que pertencem à classe de sintase de ON ou por redução de nitrato inorgânico, é uma das moléculas de sinalização envolvidas na vasodilatação e neurotransmissão¹²³.

O ON também é liberado pelos fagócitos (monócitos, macrófagos e neutrófilos), como resultado da reação do sistema imune¹²⁴. Eles reagem com $\text{O}_2^\cdot$, resultando na produção de uma espécie de nitrogênio altamente reativa, o peroxinitrito ($\text{ONOO}^\cdot$), um poderoso oxidante contra muitas moléculas biológicas¹²⁵. O $\text{ONOO}^\cdot$ pode ser decomposto para produzir radicais $\text{OH}^\cdot$, independentemente da presença de metais de transição¹²⁶. Em estudo prévio, demosntramos um aumento na concentração de

nitrito/nitrato um marcador da presença de ON em cérebro de ratos idosos após serem submetidos a fratura de tibia¹²⁷.

Alguns estudos ressaltam que a atividade das MMPs podem ser aumentada pela presença de citocinas pró-inflamatórias e pelas EROs e ERNs^{128,129}. Como a regulação e ativação da expressão das MMPs são complexas e bem controladas, a perda dessa homeostase leva à degradação da lâmina basal e das junções apertadas da BHE e, como consequência, aumento da permeabilidade¹³⁰.

Com a perda da integridade da BHE, neurônios se tornam altamente vulneráveis aos efeitos das EROs e ERNs¹³¹. Tal suscetibilidade ocorre devido ao seu alto estado metabólico, formado por grande quantidade de ácidos graxos com tendência a peroxidação lipídica, alta concentração de metais de transição capazes de levar a formação de EROs e baixa quantidade de antioxidantes¹³².

Dessa forma, o estresse oxidativo tem surgido como um potencial mecanismo implicado na patogênese da DCPO⁹¹. Há evidência de que o estresse oxidativo está relacionado com o desenvolvimento da DCPO pela liberação de neurotransmissores que contribuem para o declínio cognitivo¹³³. Ji e colaboradores¹³⁴ hipotetizaram que certos parâmetros de estresse oxidativo, como o malonaldeído (MDA) possam ser preditivos de DCPO em doentes idosos após cirurgia ortopédica. Além de níveis elevados de MDA, apresentavam níveis aumentados de pTau/Aβ1-42 no líquido cefalorraquidiano. Estes resultados são sugestivos de que os biomarcadores de neurodegeneração estejam também relacionados com o desenvolvimento de DCPO.

Tanto Zheng em 2016 como Cheng em 2013, escolheram os níveis de 8-iso-PG como indicador da resposta ao estresse oxidativo por ser um dos produtos da peroxidação lipídica^{135,136}. Este apresentou-se mais elevados 7 dias após cirurgia em pacientes com DCPO. Em estudo mais recente, de 2017 conduzido por Wu, propôs-se a hipótese de que a tioredoxina possa ser também um potencial biomarcador para DCPO, uma vez que esta é uma proteína antioxidante que modula a sinalização celular, inflamação, crescimento e apoptose celular¹³⁷. Os seus níveis eram mais elevados nos idosos com DCPO comparativamente aos no idoso sem DCPO. Uma vez que esta é liberada pelas células na presença de estresse oxidativo, os níveis de TRX circulante é um bom indicador de estresse oxidativo, estando este, envolvido na ocorrência de DCPO¹³⁷.

Da mesma forma como encontrado nos estudos clínicos, um estudo pré-clínico recente, mostrou o envolvimento do estresse oxidativo sobre a DCPO em ratos idosos

submetidos à fratura de tíbia¹⁵. Concluiu-se que, em ratos idosos submetidos em modelo experimental de fratura na tíbia houve peroxidação lipídica e oxidação proteica através da elevação MDA e proteínas carboniladas no córtex pré-frontal e hipocampo, com diminuição de enzimas antioxidantes nas mesmas estruturas cerebrais.

Evidências mostram que mediadores inflamatórios no parênquima cerebral podem levar à déficit de neurotransmissores, bem como interferências no metabolismo oxidativo, elevando a produção de EROs^{138,139}, ocasionando em lesão cerebral e redução das funções do hipocampo e córtex pré-frontal como aprendizado e memória^{140,141}. Assim, um aumento persistente de estresse oxidativo, proveniente de vias como as reguladas por citocinas pró-inflamatórias, resultam na redução da neurogênese no hipocampo e da sobrevivência dos mesmos¹⁴². Bem como, alterações na arborização dendrítica destes neurônios e redução das funções do hipocampo como aprendizado e memória¹⁴⁰.

Portanto, a associação de estresse oxidativo e a neuroinflamação persistente, está relacionada a um estado de dano neuronal constante como mecanismo da DCPO em idosos. A descoberta de vias que promovem tais respostas são de grande interesse para a área médica.

1.1.4 Receptores do tipo NOD e formação do inflamassoma NLRP3

O sistema imune inato é um sistema complexo constituído por células capazes de reconhecer o patógeno ou o dano celular a partir dos RRP^s^{16,17}. Os receptores do tipo TLRs são os mais bem conhecidos ao identificar moléculas específicas presentes no patógeno, denominados como PAMPs ou DAMPs^{18,19}.

Assim como os TLRs, foram conhecidos posteriormente os receptores NLRs, que além de reconhecerem os PAMPs, reconhecem também os DAMPs¹⁶. O reconhecimento dos DAMPs e a ativação destes receptores é crucial para o desenvolvimento de respostas inflamatórias durante o dano tecidual²⁰.

Os NLRs possuem localização citoplasmática, ao reconhecerem DAMPs ou PAMPs, se oligomerizam para formar o inflamassoma, um complexo contendo múltiplas proteínas¹⁴³. Dentre a família de receptores NLRs, o NLRP3 é um dos inflamassomas mais bem descritos²². NLRP3 é também conhecido como criopirina ou NALP3, sendo expresso na maioria das células da linhagem mielóide, inclusive na micróglia e tem um papel importante na regulação da imunidade inata^{26,144,145}.

O inflamassoma é então composto pela molécula NLRP3, por uma proteína adaptadora ASC com domínio N-terminal efetor de piridina e uma porção responsável pelo recrutamento de caspase (CARD) e pela proteína pró-caspase-1 (Figura 3)²³. O NLRP3 que atua como uma proteína sensora/receptora de localização citosólica que serve como uma plataforma para a formação do complexo com a proteína adaptadora ASC e a proteína efetora a pró-caspase-1.

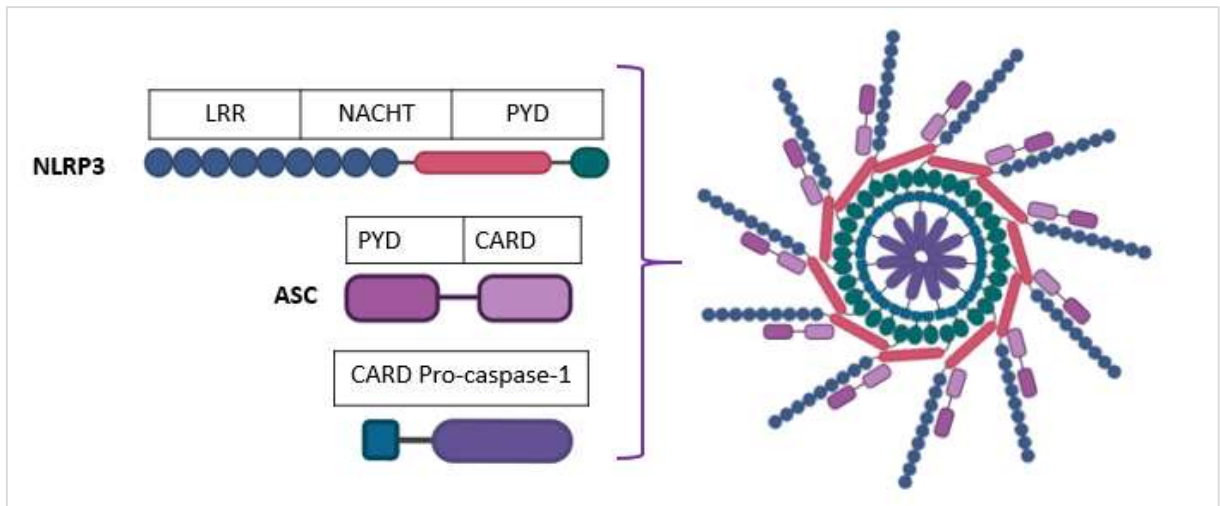


Figura 3 – Esquema da estrutura do complexo inflamassoma NLRP3.

Fonte: Adaptado de Schroder e Tschoop²⁷ e Hugles e O'Neill¹³⁸.

A ativação do inflamassoma NLRP3 ocorre em duas etapas^{146–148}. A primeira ocorre pelo RRs como TLRs, receptor de IL-1 β ou de TNF α no reconhecimento de PAMPs ou DAMPs, os quais levam à ativação de uma cascata de sinalização que culmina na translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo, o que induz expressão de NLRP3 e a transcrição da pró-IL-1 β e pró-IL-18¹⁴⁹. No segundo sinal, uma grande variedade de PAMPs e DAMPs pode induzir a oligomerização e ativação do NLRP3, com recrutamento e interação de ASC e pró-caspase-1 para resultar em autoclivagem da caspase-1 e, finalmente na produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e IL-18 e uma forma de morte celular conhecida como piroptose^{150,151}.

O segundo sinal pode ser caracterizado por três sinais distintos, o primeiro envolve a ativação da adenosina trifosfato (ATP), que atua como um agonista do NLRP3 através de um receptor purinérgico dependente de P2X7 (P2X7), responsável pelo efluxo de potássio (K⁺)¹⁵². O segundo, envolve com a consequente liberação de proteases, como a catepsina B e o outro relacionado com a ativação de EROs formadas pela disfunção mitocondrial (Figura 4)¹⁵³.

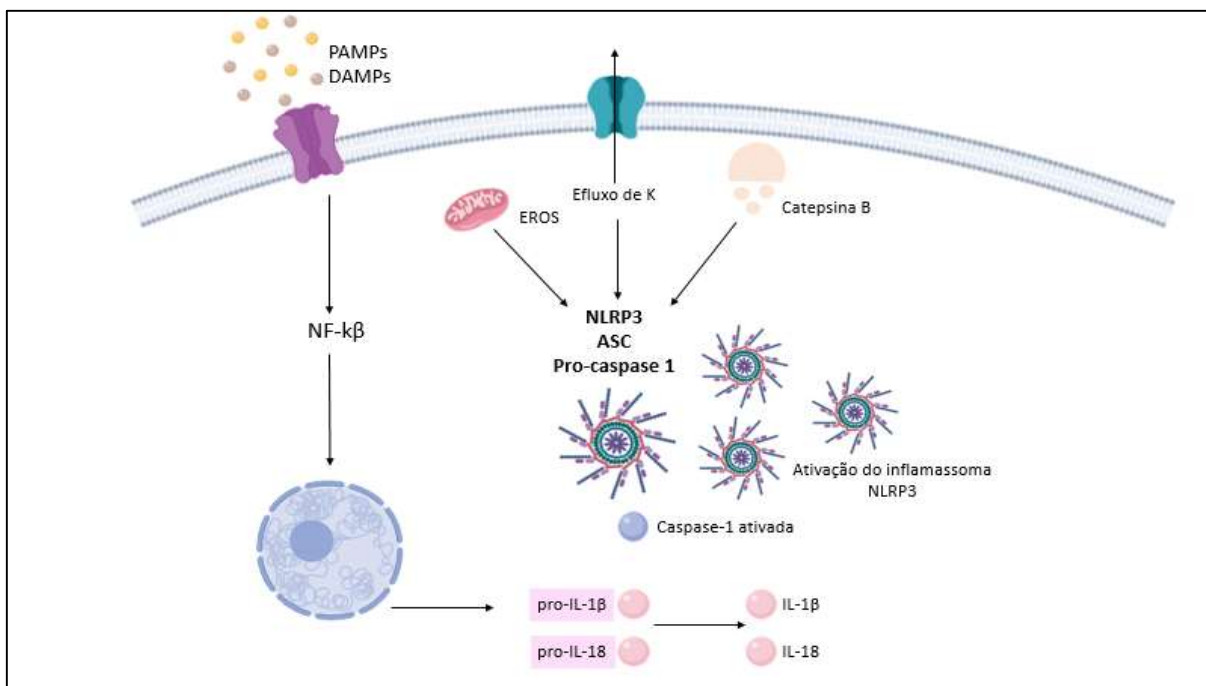


Figura 4 – Ilustração esquemática da ativação do inflamassoma NLRP3.

Fonte: Adaptado de Schao e colaboradores¹⁵².

Embora a ativação do inflamassoma seja benéfica, a desregulação da sua ativação pode levar à exacerbação dos sintomas em doenças infecciosas e ao desenvolvimento de desordens inflamatórias^{151,154,155}. A ativação do NLRP3 tem sido implicada em vários modelos de doenças humanas¹⁵¹.

No SNC, o NLRP3 é o mais abundante inflamassoma, sendo uma molécula chave em processos de neuroinflamação¹⁹. Eles servem como ligantes em células como a micróglia e astrócitos¹⁵⁶. Em modelo animal que mimetiza a depressão, a micróglia foi a primeira célula a elevar a expressão do receptor NLRP3, associada à elevação dos níveis de IL-1β¹⁵⁷.

Em encefalomielite autoimune experimental (EAE), relatos sobre o papel de NLRP3 na doença são numerosos^{158,159}. Estudos com camundongos *knockout* revelaram que a ausência de NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1β e IL-18 resulta em severidade significativamente reduzida da doença¹⁶⁰.

Luo e colaboradores¹⁶¹, indicaram que a ativação do inflamassoma é crucial na apresentação clínica da doença de forma severa. Além disso, foi demonstrado que NLRP3 tem um papel crítico na migração de células T helper para o SNC durante a EAE¹⁶².

Estudos recentes demonstram que a ativação persistente deste complexo está envolvida na patogênese de doenças neurodegenerativas com perfil neuroinflamatório, como doença de Alzheimer e de Parkinson^{150,163}. Nesse sentido, em tais doenças o hipocampo e córtex pré-frontal são alvo e, fisiologicamente possuem alta densidade dos receptores de IL-1 β ^{164,165}. Embora seja necessário a expressão de tais receptores para a aprendizagem normal e processos de memória, níveis mais altos também podem produzir diminuição da sua função¹⁶⁶. Sugere-se que outras doenças com condições neuroinflamatórias particularmente pelo aumento de IL-1 β e IL-18, possam ter o envolvimento de NLRP3 em sua fisiopatologia a exemplo a disfunção aguda e em longo prazo após a sepse experimental¹⁶⁷.

Tendo em vista o exposto até o momento, nossa hipótese é de que o estresse oxidativo e a reação inflamatória encefálica gerada durante a cirurgia ortopédica por fratura de tíbia em idosos, possa ser potencializada pela ativação do inflamassoma NLRP3 e estariam relacionados com alterações comportamentais características da DCPO. Dessa forma, surge a necessidade de buscar novas intervenções que atuem em diferentes e importantes fatores que causam o dano cognitivo, visto essa necessidade, houve-se então a possibilidade de inibir a via do inflamassoma NLRP3, com o intuito de encontrar dados mais concretos sobre o envolvimento deste mecanismo na DCPO em ratos idosos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do inflamassoma NLRP3 na DCPO em ratos submetidos à fratura de tíbia sobre parâmetros neuroinflamatórios, neuroquímicos e comportamentais em ratos idosos comparados aos ratos jovens.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sobrevida de ratos idosos comparado aos jovens em 7 dias após serem submetidos ao procedimento cirúrgico de fratura de tíbia seguido pela administração do inibidor específico de NLRP3.
- Avaliar a memória de reconhecimento de objetos de ratos idosos comparado aos jovens em 7 dias após serem submetidos ao procedimento cirúrgico de fratura de tíbia seguindo pela administração do inibidor específico de NLRP3.
- Mensurar a formação de nitrito/nitrato e mieloperoxidase no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos idosos comparado aos jovens em 7 dias após serem submetidos ao procedimento cirúrgico de fratura de tíbia seguindo pela administração do inibidor específico de NLRP3.
- Avaliar o dano oxidativo em lipídios, proteínas e atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase e catalase no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos idosos comparado aos jovens em 7 dias após serem submetidos ao procedimento cirúrgico de fratura de tíbia seguindo pela administração do inibidor específico de NLRP3.
- Avaliar a atividade da succinato desidrogenase (SDH) no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos idosos comparado aos jovens em 7 dias após serem submetidos ao procedimento cirúrgico de fratura de tíbia seguindo pela administração do inibidor específico de NLRP3.
- Avaliar a atividade da cadeia respiratória mitocondrial I, II, III e IV no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos idosos comparado aos jovens em 7 dias após serem submetidos ao procedimento cirúrgico de fratura de tíbia seguindo pela administração do inibidor específico de NLRP3.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental pré-clínico utilizando modelo animal de doença.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

O inibidor de formação do NLRP3, MCC950 foi obtido de Sigma, St. Louis, USA. Os reagentes utilizados para as análises bioquímicas foram: ácido tiobarbitúrico, 1,1,3,3 -tetrametoxipropano, brometo de hexadeciltrimetilamônio, dinitrofenilhidrazina, epinefrina, catalase de fígado bovino, albumina bovina, sulfanilamina, azida sódica, naftil etilenodiaminadicloridrato e reagente de Griess (Sigma, St. Louis, USA), ácido clorídrico, álcool etílico, acetato de etila, hidróxido de sódio, carbonato de sódio, ácido tricloroacético e peróxido de hidrogênio, ácido aminoacético (Labsynth, São Paulo, Brasil).

Para a realização das técnicas laboratoriais foram utilizados os seguintes equipamentos: agitador magnético (752A, Fisatom), balança analítica (M214A, BEL engineering), banho-maria (DeLeo equipamentos laboratoriais), espectrofotômetro (NOVA1103, Novainstruments), espectrofotômetro (U2010, Hitachi), estufa de secagem (DeLeo), Freezer (F21, Eletrolux), homogeneizador potter (Marconi), leitor de microplaca (TP reader, Thermo Plate), medidor de pH (pHB500, ION), microcentrífuga refrigerada (NT805, Novatécnica), osmose reversa (RO/0520, Permutation), refrigerador (R270, Eletrolux), Vórtex (Biomixer).

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados um total de 42 ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*) com 60 dias de vida e 42 ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*) com 240 dias de vida, adquiridos do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e foram mantidos no Biotério UNISUL. Os animais tiveram acesso livre à água e alimento (ração comercial específica para a espécie). Foram alocados 4 animais por caixas, alojadas em ambiente que possui sistema de exaustão

de ar e controle de temperatura de acordo com as condições ideais para a espécie em questão. Sendo que a temperatura foi mantida a $22^{\circ}\pm 1$ e sistema de iluminação que garante 12 horas de ambiente claro e 12 horas de ambiente escuro.

Com base em estudos prévios em modelos animais¹⁶⁸, para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias, calculou-se o seguinte número de animais por grupo, 6 animais para as análises bioquímicas e 12 animais para cada grupo para os testes comportamentais, considerando um erro alfa de 0,05 e poder de 80%.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

3.4.1 Desenho experimental

Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais (figura 5): sham + salina 60 dias, FT+salina 60 dias, FT+ MCC950 60 dias, sham + salina 240 dias, FT + salina 240 (n=28), FT + MCC950 240 dias¹⁶⁹. No tempo zero após o protocolo de indução de fratura da tíbia, os animais receberam salina ou MCC950 via intracerebroventricular, na cisterna magna com o auxílio de um aparato estereotáxico, de acordo com o grupo experimental a qual pertence. Em um tempo de 7 dias após a fratura de tíbia os ratos foram submetidos aos testes comportamentais e 24 horas após os testes comportamentais, o hipocampo e córtex pré-frontal foram isolados para as análises de estresse oxidativo, nitrito/nitrato, mieloperoxidase, e atividade da cadeia respiratória mitocondrial e SDH.

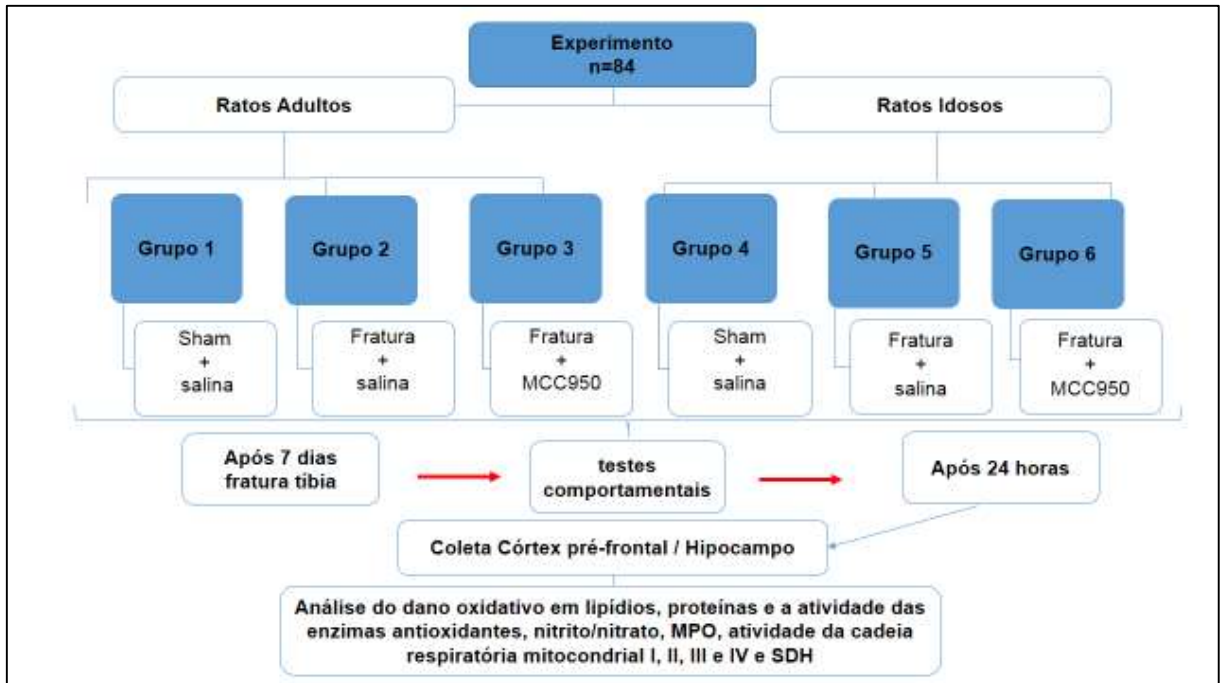


Figura 5 – Esquema representativo do experimento.

3.4.2 Modelo de fratura de tíbia

O modelo foi realizado conforme (figura 6) onde os animais foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) i.p e o membro traseiro esquerdo preparado para cirurgia. A analgesia (dipirona, 1mg/kg) foi administrada por via subcutânea. Uma incisão longitudinal foi feita a partir do joelho até o terço médio da tíbia. O tecido subcutâneo dissecado e músculos isolados até o tendão patelar e do periósteo tibial. Um orifício de 0,5mm na tíbia proximal foi perfurado com uma agulha de calibre 40x12mm logo abaixo e medial ao tendão patelar para inserção no canal intramedular. Uma haste de aço inoxidável de 1mm foi então inserida no canal até o terço distal da tibial. Subsequentemente, a fíbula e os músculos que rodeiam a tíbia foram isolados, o periósteo desinserido ao longo de uma distância de 10mm de modo circunferencial, e a osteotomia foi realizada com uma tesoura na junção do terço médio e distal da tíbia. Depois de produzir a fratura, a pele foi suturada com nylon 4/0 a reposição de fluído foi feita através da administração de 0,5ml de solução salina normal injetada subcutaneamente. No grupo controle (sham) foi realizado apenas a incisão e anestesia sem a fratura da tíbia¹⁷⁰.

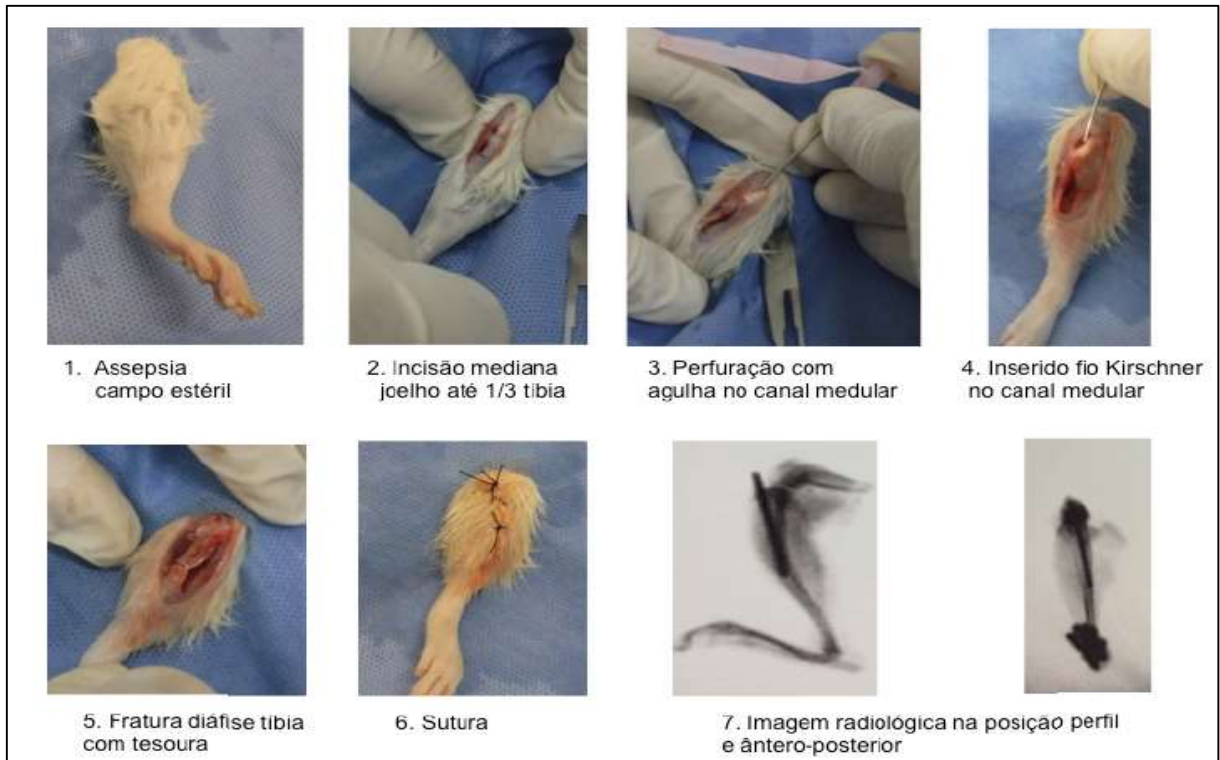


Figura 6 – Etapas do modelo experimental de fratura na tíbia.

Fonte: Back Netto¹⁷¹.

3.5 ANÁLISES

3.5.1 Coleta das amostras

A retirada das amostras biológicas foram feitas após a morte indolor assistida por overdose de tiopental (0,5 g/Kg) 7 dias após a FT subsequentemente aos testes comportamentais. As estruturas cerebrais: hipocampo e córtex pré-frontal foram cuidadosamente dissecadas, armazenadas em tubos do tipo Eppendorf e mantidas sob refrigeração em freezer -80°C até a realização das análises.

3.5.2 Análise da Sobrevida

Para avaliação da sobrevida, os animais foram observados diariamente, durante 7 dias após a indução de FT para verificar as taxas de mortalidade¹⁷².

3.5.3 Reconhecimento de objetos

Os testes comportamentais começaram após 7 dias da cirurgia de FT, sendo testados individualmente. Antes de começar as sessões, os animais foram alojados na sala de testes por pelo menos 30 minutos. Todas as sessões foram gravadas por câmeras de vídeo com resolução 1280 x 720 para análises posteriores. O reconhecimento é definido como o processo pelo qual um sujeito está ciente de que um estímulo foi previamente experimentado. É fortemente dependente da memória, uma vez que requer uma série de operações cognitivas (como percepção, discriminação, identificação e comparações) que se baseiam em informações previamente conhecidas para “combinar” o evento observado com uma memória previamente vivenciada.

No primeiro dia foi realizado o treino para habituação do animal ao ambiente, onde o animal é colocado cuidadosamente em um quadrante do aparato o qual explora o ambiente por 5 minutos sem nenhum objeto. No segundo dia o animal é recolocado no aparato, no qual estavam dois objetos iguais (da mesma forma, tamanho e cor), objeto A e objeto B, posicionados em dois cantos adjacentes a 10 cm da parede, e então conta-se o tempo que o animal explora cada objeto (A e B). No mesmo dia, 1 hora 30 minutos depois, se testa a memória de curta duração, quando o animal explora novamente o ambiente na presença do primeiro objeto familiar (objeto A) e o novo objeto (objeto C), e então conta-se novamente o tempo total que o animal explora cada objeto.

No dia seguinte (24 horas após este teste), avaliou-se a memória de longa duração, quando foi feito o mesmo procedimento, mas trocando o objeto C pelo objeto D (diferente do objeto A) e então contou-se o tempo de exploração de cada objeto. Todos os objetos tinham textura (lisa) e tamanho (150-200 gramas) semelhante, mas formas diferentes. Neste teste é utilizado o índice de reconhecimento, a fim de se calcular o tempo gasto para cada animal para explorar o objeto, expresso como uma razão ($TB/(TA+TB)$), onde TA = tempo gasto para explorar o objeto familiar; e TB = tempo gasto para explorar o novo objeto¹⁷³.

3.5.4 Avaliação da atividade da mieloperoxidase

A atividade da MPO é um indicativo do infiltrado de neutrófilos tecidual. Neste sentido, as amostras foram homogeneizadas (50 mg/ml) em 0.5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugadas. A suspensão foi sonicada três vezes durante 30 segundos até a obtenção do sobrenadante. Uma alíquota do sobrenadante foi misturada com uma solução de 1,6 mM tetrametilbenzidina (TMB) e 1 mM H₂O₂. A atividade da MPO foi mensurada espectrofotometricamente em 650 nm a 37°C. Os resultados foram expressos como mU/mg proteína¹⁷⁴.

3.5.5 Determinação de nitrito/nitrato

Foi mensurado por meio da utilização da reação de Griess, por adição de 100µL de reagente de Griess [0,1% (w/v) naftil etilenodiaminadicloridrato em H₂O e 1% (p/v) sulfanilamida em 5% (v/v) H₃PO₄ em volume concentrado (1:1)] para 100 µL de amostra. A densidade óptica foi medida a 550 nm usando um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como nmol/mg proteína¹⁷⁵.

3.5.6 Avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Como índice dos efeitos do estresse oxidativo sobre os lipídeos, foi utilizada a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação ácida de aquecimento¹⁷⁶. Resumidamente, as amostras foram misturadas com 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%, e, em seguida, aquecidas em banho de água fervente a 100 °C durante 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 535 nm, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos como equivalentes de MDA/mg de proteína.

3.5.7 Avaliação de carbonilação protéica

O efeito do estresse oxidativo em proteínas foi avaliado por meio da determinação de grupos carbonil baseado na reação com dinitrofenilhidrazina. As proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20%, o precipitado

foi dissolvido e em seguida adicionado dinitrofenilhidrazina. Incuba-se por uma hora em temperatura ambiente. Após esse período redissolve-se as amostras com 1 mL de NaOH 3% e incuba-se em banho-maria por 30 min a 60°C. As proteínas foram precipitadas, e a absorbância foi aferida em 370nm. Os resultados foram expressos em concentração de proteínas carboniladas nmol/mg de proteína¹⁷⁷.

3.5.8 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

A atividade enzimática da superóxido dismutase foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina. As amostras teciduais foram homogeneizadas em 1mL de tampão glicina pH 10,2, contendo 0,75g de ácido aminoacético (glicina) em 200mL de água purificada e centrifugadas por 10 min em 3000 rpm, em temperatura ambiente. O reagente branco será preparado a partir da mistura de 10µL de catalase 0,0024g/mL (0,0018g de catalase em 720µL de água purificada) com 970µL de tampão glicina a 32°C. Em seguida foi adicionado a quantidade de 17µL de adrenalina 60mM (0,006g de adrenalina em 300µL de água purificada e 3µL de HCl). A leitura do reagente branco foi realizada a cada 10 segundos, durante 180 segundos, a fim de determinar a curva de calibração. Este processo será repetido após a leitura de quatro amostras e sempre que houver a troca de reagentes. As amostras foram preparadas a partir da mistura de 10µL de catalase 0,0024g/mL, 3µL a 7µL de amostra e 970µL de tampão glicina a 32°C. A leitura da amostra foi realizada a cada 10 segundos, durante 180 segundos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de lâmpada de deutério, em cubetas de plástico, a 480nm. A atividade da SOD foi expressa em U de SOD/mg de proteína¹⁷⁸.

A atividade enzimática da catalase foi determinada pela diminuição no consumo de peróxido de hidrogênio. As amostras teciduais foram homogeneizadas em 1mL de tampão catalase [PBS+NaCl (pH 7,0), contendo 8,0086g de NaCl (136,9 mM), 0,1496g de KH₂PO₄ (1,1 mM) e 0,0383g de Na₂HPO₄ (0,27 mM)] e centrifugadas por 10 min em 3000 rpm, em temperatura ambiente. O reagente branco foi preparado a partir da mistura de 100µL de sobrenadante da amostra com 1mL de tampão catalase e foi utilizado para zerar o espectrofotômetro. O reagente amostra foi preparado a partir da mistura de 100µL de sobrenadante da amostra com 1mL de tampão catalase contendo H₂O₂ (25mL de tampão catalase e 400µL de H₂O₂, protegido da luz). A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro de lâmpada de deutério, em

cubetas de quartzo, a 240nm. Foram realizadas mensurações referentes ao decaimento de absorbância nos tempos 0, 30 e 60 segundos. O processo foi repetido para cada amostra. A atividade da CAT foi expressa em U de CAT/mg de proteína¹⁷⁹.

3.5.9 Atividade da enzima succinato desidrogenase

A atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) foi determinada de acordo com o método de Fischer e colegas medidos seguindo a diminuição da absorbância devido à redução de 2,6-dicloroindofenol (2,6-DCIP) a 600nm com 700nm como o comprimento de onda de referência ($\epsilon = 19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na presença de metossulfato de fenazina (PMS)¹⁸⁰. A mistura de reação consistindo de 40mM de fosfato de potássio, pH 7,4, 16mM de succinato e 8 mM de 2,6-DCIP foi pré-incubada com 40-80µg de proteína homogeneizada a 30°C por 20min. Posteriormente, 4mM de azida de sódio, 7 µM de rotenona e 40 µM de 2,6-DCIP foram adicionados, e a reação foi iniciada por uma adição de 1 mM de PMS e foi monitorada por 5 min. A atividade foi expressa em nmo/min x mg de proteína.

3.5.10 Atividade da cadeia respiratória mitocondrial

Determinação da atividade do complexo I: A atividade do complexo I foi avaliada pela taxa de Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) dependente da redução do ferrocianeto de potássio, este último sendo utilizado como acceptor de elétrons¹⁸¹. No meio de reação foi adicionado tampão fosfato de potássio 100mM, ferrocianeto 10mM, NADH 14mM, rotenona 2mM e amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a cada 60 segundos, durante 3 min, em 420nm.

Determinação da atividade do complexo II: foi mensurada pela diminuição da absorbância do 2,6-dicloroindofenol (DCIP)¹⁸². A amostra foi adicionada a um meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 62,5mM, succinato de sódio 250mM e DCIP 0,5mM, seguindo de incubação por 20 minutos à 30°C em banho-maria. Após a incubação foi adicionado azida sódica na concentração de 100mM, rotenona a 2mM e novamente DCIP 0,5mM, para então realizar leitura em espectrofotômetro em 600nm por 5 min, sendo registrados a absorbância a cada minuto.

Determinação da atividade do complexo II-III o meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 40mM (pH 7,4) contendo 16mM de succinato de sódio, foi

pré-incubado com 40-8µg de proteínas do homogeneizado a 30°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4mM de azida sódica e 7µM de rotenona e a reação se iniciara pela adição de 0,6 µg/mL de citocromo c e as absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 550nm. A atividade do complexo II-III foi medida pelo aumento da absorbância causado pela redução do citocromo c¹⁵¹.

Determinação da atividade do complexo IV: foi determinada de acordo com a técnica descrita por Rustin et al¹⁸³. O meio de incubação contém tampão fosfato de potássio 10mM (pH 7,0), 0,6mM de n-dodecil-D-maltosídeo e 10-2µg de proteínas (homogeneizado). A reação foi iniciada após a adição de 0,7µg de citocromo c previamente reduzido. A atividade do complexo IV foi medida a 25°C por 10 minutos pelo decréscimo da absorbância a 550nm devido à oxidação do citocromo c reduzido¹⁸¹⁻¹⁸³.

3.5.11 Determinação de proteínas totais

Todos os resultados das análises bioquímicas foram normalizados com a quantidade de proteínas avaliada de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores¹⁸⁴.

3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística dos dados e a elaboração dos gráficos foi realizada no programa estatístico Graphpad Prism® versão 8.0. Para as análises bioquímicas, os dados foram apresentados como média ± EPM e analisados por ANOVA, seguido de teste post hoc Tukey.

Dados da tarefa de habituação ao campo aberto e reconhecimento de objetos foram relatados como média ± EPM, e as comparações dentre os grupos foram feitas utilizando-se teste *t* de Student pareado. Sobrevida foi avaliada por Kaplan-Meier. Para todas as análises, foi adotado um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

A presente tese teve seu projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UNISUL, protocolo 19.034.4.01.IV. A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos – DBCA-2016¹⁸⁵.

4. ARTIGO

Nesta sessão será apresentado o artigo intitulado: **“NLRP3 activation contributes to postoperative cognitive dysfunction in elderly rats”**, o mesmo será submetido para a revista Brain Behavior and Immunity, com fator de impacto de 7.217 e classificação A1 no Qualis CAPES na área de Medicina II.

NLRP3 activation contributes to postoperative cognitive dysfunction in elderly rats

Sandra Bonfante^a, Martins Back Netto^a, Aloir Neri de Oliveira Junior^a, Larissa Joaquim, Lucinéia Gainski Danielski, Kiuanne Lino Lobo Metzker, Taina Cidreira, Everton Lazzarin, Khiany Mathias^a, Erick Bagio^a, Beatriz Steiner^a, Marina Goulart da Silva^b, Guilherme Cabreira Daros^b, Isabela da Silva Lemos^c, Rafaela Tezza Matiola^c, Gislaine Tezza Rezin^a, Rafael Mariano de Bitencourt^b, Emílio Luiz Streck^c, Fabricia Petronilho^{a*}

^aLaboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil;

^bBehavioral Neuroscience Laboratory, Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil;

^cLaboratory of Experimental Neurology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil.

*Address correspondence to this author at the Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil; Tel/Fax: +55 48 3621-3363; E-mail: petronilhofc@gmail.com

APÊNDICE

APÊNDICE A – Normas da revista escolhidas para submissão do artigo resultante da tese



BRAIN, BEHAVIOR, AND IMMUNITY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.6



ISSN: 0889-1591

DESCRIPTION

Brain, Behavior, and Immunity, founded in 1987, is the official journal of the **Psychoneuroimmunology Research Society (PNIRS)**. This innovative journal publishes peer-reviewed basic, experimental, and clinical studies dealing with **behavioral, neural, endocrine, and immune system** interactions in humans and animals. It is an international, interdisciplinary journal devoted to original research in neuroscience, immunology, integrative physiology, behavioral biology, psychiatry, psychology, and clinical medicine and is inclusive of research at the molecular, cellular, social, and whole organism level. The journal features online [submission](#) and review. Manuscripts are typically peer-reviewed and returned to authors within 30 days of submission, leading to timely publication of experimental results. There are no submission fees or page charges for *Brain, Behavior, and Immunity*, which is published eight times a year. Detailed instructions for authors can be found at <http://www.elsevier.com/journals/brain-behavior-and-immunity/0889-1591/guide-for-authors>.

Research areas include: Physiological mechanisms that convey messages between the immune and nervous systems and regulate their functions Stress and immunity, including the role of stress-related hormones and neurotransmitters on the immune system Actions of cytokines, growth factors and PAMP activation on neuronal and glial cells that regulate behavior, learning, memory and neurogenesis Role of hormones, growth factors and cytokines in the immune and central or peripheral nervous systems Interactions between the immune system and brain that are involved in development of neurological, psychiatric, and mental health disorders Role of immunological processes in neurodegenerative disorders The effects of psychotropic medications on immunological mechanisms and their potential relevance to therapeutic interventions Neuroimaging studies examining how immunological mechanisms affect brain structure and function Clinical trials and experimental studies testing the effects on both immune stimulation and immune suppression on brain and behavior The role of microglia in pain, psychological processes and in psychiatric disorders Immunological mechanisms involved in traumatic brain injury and its resolution Immunologic disorders, infection and behavior Role of the immune system in development and maintenance of inflammatory and chronic pain Immune mechanisms that regulate the blood-brain-interface (BBi) Immune factors that affect health psychology Sleep, exercise, immunity and health Immune system interactions that affect behavior following use of psychotropic drugs, alcohol and other drugs of abuse Healthy aging of the immune system and brain Role of inflammation and stress during perinatal development Cancer and its treatment, stem cells and their effects on brain behavior and immunity Reciprocal communication between the microbiome, immune and nervous systems Regulation of nerve injury and repair by the immune system Psychosocial, behavioral, and neuroendocrine influences on immunity and on the development and progression of immunologically-mediated diseases Nutrition, inflammation, obesity and behavior Genomics of behavior and immunity

ANEXO A- Parecer Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais**Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)**

Palhoça, 09 de dezembro de 2019
Registro na CEUA Nº 19.034.4.01.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 envolvimento do inflamassoma NLPR-3 na disfunção cognitiva pós-operatória", registrada com o nº 19.034.4.01.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 09 de dezembro de 2019.

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

ANEXO B – Produção científica publicada durante o período do doutorado

Molecular Neurobiology
<https://doi.org/10.1007/s12035-020-02089-9>



NLRP3 Activation Contributes to Acute Brain Damage Leading to Memory Impairment in Sepsis-Surviving Rats

Lucineia Gainski Danielski¹ · Amanda Della Giustina¹ · Sandra Bonfante¹ · Mariana Pereira de Souza Goldim¹ · Larissa Joaquim¹ · Kiuane Lobo Metzker¹ · Erica Bernardo Biehl¹ · Thaynan Vieira¹ · Fabiana Durante de Medeiros¹ · Naiana da Rosa¹ · Jaqueline Generoso² · Lutiana Simoes² · Hémelin Resende Farias³ · Isabela da Silva Lemos³ · Vijayaree Giridharan⁴ · Gislaine Tezza Rezin¹ · Jucelia Jeremias Fortunato¹ · Rafael Mariano Bitencourt¹ · Emilio Luiz Streck³ · Felipe Dal-Pizzol² · Tatiana Barichello^{2,4} · Fabricia Petronilho¹

Received: 2 April 2020 / Accepted: 24 August 2020
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Sepsis survivors present acute and long-term cognitive impairment and the pathophysiology of neurological dysfunction in sepsis involves microglial activation. Recently, the involvement of cytosolic receptors capable of forming protein complexes called inflammasomes have been demonstrated to perpetuate neuroinflammation. Thus, we investigated the involvement of the NLRP3 inflammasome activation on early and late brain changes in experimental sepsis. Two-month-old male Wistar rats were submitted to the sepsis model by cecal ligation and perforation (CLP group) or laparotomy only (sham group). Immediately after surgery, the animals received saline or NLRP3 inflammasome formation inhibitor (MCC950, 140 ng/kg) intracerebroventricularly. Prefrontal cortex and hippocampus were isolated for cytokine analysis, microglial and astrocyte activation, oxidative stress measurements, nitric oxide formation, and mitochondrial respiratory chain activity at 24 h after CLP. A subset of animals was followed for 10 days for survival assessment, and then behavioral tests were performed. The administration of MCC950 restored the elevation of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and IL-10 cytokine levels in the hippocampus. NLRP3 receptor levels increased in the prefrontal cortex and hippocampus at 24 h after sepsis, associated with microglial, but not astrocyte, activation. MCC950 reduced oxidative damage to lipids and proteins as well as preserved the activity of the enzyme SOD in the hippocampus. Mitochondrial respiratory chain activity presented variations in both structures studied. MCC950 reduced microglial activation, decreased acute neurochemical and behavioral alteration, and increased survival after experimental sepsis.

Keywords Sepsis · NLRP3 · Inflammasome · MCC950 · Neuroinflammation · Cognitive impairment

Introduction

In the last decade, there has been a decrease in mortality in patients with sepsis. Age-standardized sepsis incidence fell by 37% and mortality decreased by 52.8% from 1990 to 2017 [1]. In this sense, other challenges arise, especially those related to quality of life and acute and persistent neurological damage presented by survivors. Surviving an episode of sepsis represents a major risk for the development of long-term neurocognitive dysfunction affecting a patient's ability to live independently, as well as reducing his work ability [2]. Several studies have attributed these behavioral changes to neuronal damage during sepsis and the microglial activation is involved in this process [3–6]. When activated, microglial cells are capable of indirectly causing neuronal damage by releasing inflammatory mediators such as IL-1 β and TNF- α , or by reducing their production of neurotrophins. Directly, microglial cells cause neuronal damage by activation of

✉ Fabricia Petronilho
fabricia.petronilho@unissul.br

¹ Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil

² Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil

³ Laboratory of Experimental Neurology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil

⁴ Translational Psychiatry Program, Faillace Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX 77054, USA



Lipoic Acid and Fish Oil Combination Potentiates Neuroinflammation and Oxidative Stress Regulation and Prevents Cognitive Decline of Rats After Sepsis

Amanda Della Giustina¹ · Mariana Pereira de Souza Goldim¹ · Lucinéia Gainski Danielski¹ · Leandro Garbossa¹ · Aloir Neri Oliveira Junior¹ · Thainá Cidreira¹ · Tais Denicol¹ · Sandra Bonfante¹ · Naiana da Rosa¹ · Jucélia Jeremias Fortunato¹ · Juliete Palandi² · Bruna Hoffmann de Oliveira² · Daniel Fernandes Martins² · Franciane Bobinski² · Michelle Garcez³ · Tatiani Bellettini-Santos³ · Josiane Budni³ · Gabriela Colpo⁴ · Giselli Scaini⁴ · Vijayaree V. Giridharan⁴ · Tatiana Barichello^{4,5} · Fabricia Petronilho^{1,6}

Received: 26 March 2020 / Accepted: 22 July 2020
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Sepsis causes organ dysfunction due to an infection, and it may impact the central nervous system. Neuroinflammation and oxidative stress are related to brain dysfunction after sepsis. Both processes affect microglia activation, neurotrophin production, and long-term cognition. Fish oil (FO) is an anti-inflammatory compound, and lipoic acid (LA) is a universal antioxidant substance. They exert neuroprotective roles when administered alone. We aimed at determining the effect of FO+LA combination on microglia activation and brain dysfunction after sepsis. Microglia cells from neonatal pups were co-treated with lipopolysaccharide (LPS) and FO or LA, alone or combined, for 24 h. Cytokine levels were measured. *Wistar* rats were subjected to sepsis by cecal ligation and perforation (CLP) and treated orally with FO, LA, or FO+LA. At 24 h after surgery, the hippocampus, prefrontal cortex, and total cortex were obtained and assayed for levels of cytokines, myeloperoxidase (MPO) activity, protein carbonyls, superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) activity. At 10 days after surgery, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels were determined and behavioral tests were performed. The combination diminished *in vitro* levels of pro-inflammatory cytokines. The combination reduced TNF- α in the cortex, IL-1 β in the prefrontal cortex, as well as MPO activity, and decreased protein carbonyls formation in all structures. The combination enhanced catalase activity in the prefrontal cortex and hippocampus, elevated BDNF levels in all structures, and prevented behavioral impairment. In summary, the combination was effective in preventing cognitive damage by reducing neuroinflammation and oxidative stress and increasing BDNF levels.

Keywords Sepsis · Fish oil · Lipoic acid · Microglia · Oxidative stress

Fabricia Petronilho
fabricia.petronilho@unisul.br

¹ Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil

² Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina, Brazil

³ Laboratory of Neurosciences, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil

⁴ Faillace Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Translational Psychiatry Program, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX 77054, USA

⁵ Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil

⁶ Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil



Gold nanoparticles potentiates N-acetylcysteine effects on neurochemicals alterations in rats after polymicrobial sepsis

Fabricia Petronilho, Leonardo Tenfen, Amanda Della Giustina, Larissa Joaquim, Michele Novochadlo, Aloir Neri de Oliveira Junior, Erick Bagio, Mariana Pereira de Souza Goldim, Raquel Jaconi de Carli, Sandra Regina Santana de Aguiar Bonfante, Kiuanne Lino Lobo Metzker, Samara Muttini, Thayná Marinho dos Santos, Mariana Pacheco de Oliveira, Nicole Alessandra Engel, Gislaine Tezza Rezin, Luiz Alberto Kanis & Tatiana Barichello

To cite this article: Fabricia Petronilho, Leonardo Tenfen, Amanda Della Giustina, Larissa Joaquim, Michele Novochadlo, Aloir Neri de Oliveira Junior, Erick Bagio, Mariana Pereira de Souza Goldim, Raquel Jaconi de Carli, Sandra Regina Santana de Aguiar Bonfante, Kiuanne Lino Lobo Metzker, Samara Muttini, Thayná Marinho dos Santos, Mariana Pacheco de Oliveira, Nicole Alessandra Engel, Gislaine Tezza Rezin, Luiz Alberto Kanis & Tatiana Barichello (2019): Gold nanoparticles potentiates N-acetylcysteine effects on neurochemicals alterations in rats after polymicrobial sepsis, Journal of Drug Targeting, DOI: [10.1080/1061186X.2019.1678168](https://doi.org/10.1080/1061186X.2019.1678168)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/1061186X.2019.1678168>



Accepted author version posted online: 09 Oct 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Gerontology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/expgero

Aging influences in the blood-brain barrier permeability and cerebral oxidative stress in sepsis



William Margotti^a, Amanda Della Giustina^a, Mariana Pereira de Souza Goldim^a, Marcos Hubner^a, Thainá Cidreira^a, Taís Luise Denicol^a, Larissa Joaquim^a, Raquel Jaconi De Carli^a, Lucinéia Gainski Danielski^a, Kíuanne Lino Lobo Metzker^a, Sandra Bonfante^a, Tatiana Barichello^b, Fabricia Petronilho^{a,*}

^a Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina - UNISUL, Tubarão, SC, Brazil

^b Translational Psychiatry Program, Pallares Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX 77030, USA

ARTICLE INFO

Section Editor: Stephanie Baadry

Keywords:

Sepsis
Brain
Aging
Oxidative stress
Blood-brain barrier

ABSTRACT

Sepsis is a set of serious manifestations throughout the body produced by an infection, leading to changes that compromise cellular homeostasis and can result in dysfunction of the central nervous system. The elderly have a higher risk of developing sepsis than younger peoples. Under the influence of inflammatory mediators and oxidizing agents released in the periphery as a result of the infectious stimulus, changes occur in the blood-brain barrier (BBB) permeability; with neutrophil infiltration, the passage of toxic compounds, activation of microglia and production of reactive species that results in potentiation of neuroimmune response, with the progression of neuronal damage and neuroinflammation. The objective of this study is to compare BBB permeability and the development of oxidative stress in the hippocampus and prefrontal cortex of young and old rats submitted to polymicrobial sepsis induction. Male Wistar rats grouped into sham (60d), sham (210d), cecal ligation and perforation (CLP) (60d) and CLP (210d) with $n = 16$ per experimental group were evaluated using the CLP technique to induce sepsis. The brain regions were collected at 24 h after sepsis induction to determine BBB permeability, myeloperoxidase (MPO) activity as marker of neutrophil activation, nitrite/nitrate (N/N) levels as marker of reactive nitrogen species, thiobarbituric acid reactive substances as marker of lipid peroxidation, protein carbonylation as marker of protein oxidation, and activity of antioxidant enzyme catalase (CAT). There was an increase in the BBB permeability in the CLP groups, and this was enhanced with aging in both brain region. MPO activity in the brain regions increased in the CLP groups, along with a hippocampal increase in the CLP 210d group compared to the 60d group. The concentration of N/N in the brain region was increased in the CLP groups. The damage to lipids and proteins in the two structures was enhanced in the CLP groups, while only lipid peroxidation was higher in the prefrontal cortex of the CLP 210d group compared to the 60d. CAT activity in the hippocampus was decreased in both CLP groups, and this was also influenced by age, whereas in the prefrontal cortex there was only a decrease in CAT in the CLP 60d group compared to the sham 60d. These findings indicate that aging potentiated BBB permeability in sepsis, which possibly triggered an increase in neutrophil infiltration and, consequently, an increase in oxidative stress.

1. Introduction

Sepsis is a set of serious manifestations throughout the body produced by an infection. Its clinical manifestations include those associated with the infectious focus in question (Singer et al., 2016). In

terms of epidemiological characteristics, the high rates of sepsis incidence and mortality have not changed in recent decades, leading the World Health Organization (WHO) to include sepsis in global health priorities (WHO, 2018). In the United States, the incidence of sepsis is 300 cases per 100,000 inhabitants, where 1/4 of the patients who are

* Corresponding author at: Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina - UNISUL, Santa Catarina, SC, Brazil.

E-mail address: fabricia.petronilho@unisul.br (F. Petronilho).

<https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111063>

Received 10 February 2020; Received in revised form 20 July 2020; Accepted 17 August 2020

Available online 19 August 2020

0531-5565/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Neurochemistry International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuint

Early life neuroimmune challenge protects the brain after sepsis in adult rats



Drielly Florentino^a, Amanda Della Giustina^a, Mariana Pereira de Souza Goldim^a, Lucineia Gainski Danielski^a, Aloir Neri de Oliveira Junior^a, Larissa Joaquim^a, Sandra Bonfante^a, Erica Biehl^a, Naiana da Rosa^a, Deisy Fernandes^a, Fernanda Frederico Gava^b, Monique Michels^c, Jucelia Jeremias Fortunato^a, Gislaine Zilli Réus^b, Samira S. Valvassori^b, Joao Quevedo^{b,d,e,f}, Felipe Dal-Pizzol^c, Tatiana Barichello^{c,d}, Fabricia Petronilho^{b,g}

^a Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina (UNISUL), Tubarão, SC, Brazil

^b Translational Psychiatry Laboratory, Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina (UNESC), Criciúma, SC, Brazil

^c Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina (UNESC), Criciúma, Santa Catarina, Brazil

^d Center of Excellence on Mood Disorders, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA

^e Neuroscience Graduate Program, The University of Texas MD Anderson Cancer Center UTHealth Graduate School of Biomedical Sciences, Houston, TX, USA

^f Translational Psychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Sepsis
LPS-preconditioning
Neuroinflammation
Memory

ABSTRACT

Evidences has suggested that in the early life the innate immune system presents plasticity and the time and dose-adequate stimuli in this phase may program long-lasting immunological responses that persist until adulthood. We aimed to evaluate whether LPS challenge in early childhood period may modulate brain alterations after sepsis in adult life. Experiments were performed to evaluate the LPS challenge in early childhood or adult period on acute and long-term brain alterations after model of sepsis by cecal ligation and perforation (CLP) in adult life. Wistar rats were divided in saline + sham, LPS + sham, saline + CLP and LPS + CLP groups to determine cytokine levels and nitrite/nitrate concentration in cerebrospinal fluid (CSF); oxidative damage, activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase-SOD and catalase-CAT); blood brain barrier (BBB) permeability; myeloperoxidase (MPO) and epigenetic enzymes activities in the hippocampus and prefrontal cortex (at 24 h after CLP) and cognitive function, survival and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) level (at ten days after CLP). LPS-preconditioning in early life could lead to decreased levels of TNF- α and IL-6 and oxidative damage parameters in the brain after CLP in adult rats. In addition, LPS-preconditioning in early life increase CAT activity, attenuates the BBB permeability and epigenetic enzymes alterations and in long term, improves the memory, BDNF levels and survival. In conclusion, rats submitted to CLP in adulthood displayed acute neuroinflammation, neurochemical and epigenetic alteration improvement accompanied in long term by an increase in survival, neurotrophin level and memory performance when preconditioned with LPS in the early life.

1. Introduction

Early childhood is a period that the individual present high vulnerability to infection but still can have a remarkable resilience that is poorly understood (Kallikumpää et al., 2014). In this life phase the innate immune system still presents immaturity and plasticity and the time and dose-adequate stimuli may program long-lasting alterations in

immunological responses that persist until adulthood (Georgantzou and Papadopoulos, 2017).

Children growing up in rural areas, around animals and in larger families seem to develop asthma less often than do other children (Ege, 2017). These observations have led to the formulation of the hygiene hypothesis. According to this hypothesis, delays in exposure to normal bacteria in the body as well as disease-causing agents make a weaker

* Corresponding author. Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil.

E-mail address: fabricia.petronilho@unisul.br (F. Petronilho).

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104712>

Received 2 September 2019; Received in revised form 24 January 2020; Accepted 27 February 2020

Available online 29 February 2020

0197-0186/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Microvascular Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymvrs

Stanniocalcin-1 ameliorates cerebral ischemia by decrease oxidative stress and blood brain barrier permeability

Sandra Bonfante^a, Amanda Della Giustina^a, Lucineia Gainski Danielski^{ib}, Tais Denicol^b, Larissa Joaquim^a, Erica Biehl^a, Gabriel Scopel^a, Raquel Jaconi de Carli^a, Marcos Hubner^a, Taise Cardoso^a, Talita Tuon^b, Jaqueline Generoso^c, Tatiana Barichello^{c,d,e}, Silvia Terra^f, Fabricia Petronilho^{a,g}

^a Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil

^b Graduate Program in Rehabilitation Sciences, Federal University of Santa Catarina, Araranguá, SC, Brazil

^c Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil

^d Center of Excellence in Mood Disorders, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA

^e Translational Psychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA

^f Postgraduate Program Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Stroke
Stanniocalcin-1
Oxidative stress
Blood brain barrier

ABSTRACT

Blood brain barrier (BBB) permeability and oxidative stress have been reported to be important mechanisms for brain damage following ischemic stroke and stanniocalcin-1 (STC-1), a neuroprotective protein, has anti-inflammatory and anti-oxidative stress properties. Herein, we report the effect of STC-1 on BBB permeability and brain oxidative stress after stroke in an animal model. Male Wistar received an intracerebroventricularly injection of human recombinant STC-1 (100 ng/kg) or saline and were subjected to sham procedure or global cerebral ischemia/reperfusion (I/R) model. Six and 24 h after I/R, neurological evaluation was performed; at 24 h brain water content was evaluated in the total brain, and BBB permeability, nitrite/nitrate (N/N) concentration, lipid peroxidation, protein carbonyls formation, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity were determined in the hippocampus, cortex, prefrontal cortex, striatum and cerebellum. Rats exhibited neurological deficit at 6 and 24 h after I/R and STC-1 reduction at 24 h. After I/R there were an increase of brain water content, BBB permeability in the hippocampus, cortex and pre-frontal cortex and N/N in the hippocampus, and STC-1 decreased this level only in the hippocampus. STC-1 decreased lipid peroxidation in the hippocampus, cortex and prefrontal cortex and protein oxidative damage in the hippocampus and cortex. SOD activity decreased in the hippocampus, cortex and prefrontal cortex after I/R and STC-1 reestablished these levels in the hippocampus and cortex. CAT activity decreased only in the hippocampus and cortex and STC-1 increased the CAT activity in the hippocampus. Our data provide the first experimental demonstration that STC-1 reduced brain dysfunction associated with cerebral I/R in rats, by decreasing BBB permeability and oxidative stress parameters.

1. Introduction

Ischemic stroke is the primary cause of long-term disability and is the fourth leading cause of death worldwide (Mukundan and Seidenwurm, 2016). According to the World Health Organization, 50% of ischemic stroke survivors suffer from some degree of physical or

cognitive impairment, and about 20% of them require institutional care (Bustamante et al., 2017).

The incidence of ischemic stroke and the subsequent reperfusion decrease blood brain barrier (BBB) integrity and increase paracellular permeability and contribute to cerebral edema (Sadeghian et al., 2019). The destruction of BBB integrity is associated with several possible

* Corresponding author at: Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil.

E-mail address: fabricia.petronilho@unisol.br (F. Petronilho).

<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.103956>

Received 16 September 2019; Received in revised form 11 November 2019; Accepted 12 November 2019

Available online 13 November 2019

0026-2862/ © 2019 Published by Elsevier Inc.



The NLRP3 Inflammasome and Its Role in Sepsis Development

Lucinéia Gainski Danielski,¹ Amanda Della Giustina,¹ Sandra Bonfante,¹ Tatiana Barichello,^{2,3} and Fabricia Petronilho^{1,4}

Abstract— The pathophysiology of sepsis is extremely complex. During this disease, the exacerbation of the inflammatory response causes oxidative stress, alterations in mitochondrial energy dynamics, and multiple organ failure. Some studies have highlighted the important role of the NLRP3 inflammasome in sepsis. This inflammasome is a macromolecular protein complex that finely regulates the activation of caspase-1 and the production and secretion of potent pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-18. In this review, we elucidate evidences to understand the connection between sepsis development and the NLRP3 inflammasome, the most widely investigated member of this class of receptor.

KEY WORDS: sepsis; NLRP3; inflammasome; organ failure.

INTRODUCTION

Sepsis is a syndrome characterized by pathophysiologic and biochemical alterations caused by an infectious insult. These abnormalities are related to an exacerbated systemic inflammation, and they manifest as life-threatening clinical conditions [1] that may lead to multiple

organ dysfunction [2] and a mortality rate of approximately 60% [3].

The initial stage of sepsis pathophysiology involves the production of signaling molecules responsible for recruiting immune cells, such as the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and the damage-associated molecular patterns (DAMPs) and their interaction with germline-encoded receptors called pattern recognition receptors (PRRs) [4]. The involvement of Toll-like receptor-4 (TLR-4) in sepsis is well described [5–7]; however, another class of receptor has drawn attention in recent years: the nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptor (NLR) class, specifically the pyrin domain-containing 3 (NLRP3) member. NLRP3, along with other structures, generate a complex called inflammasome that can convert pro-inflammatory procaspases into their mature form, thus inducing the release of important pro-inflammatory cytokines [8, 9].

The NLRP3/caspase-1/IL-1 axis has emerged as a critical signaling pathway of the innate immune system

¹ Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil

² Laboratory of Experimental Microbiology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil

³ Center for Experimental Models in Psychiatry, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, TX, USA

⁴ To whom correspondence should be addressed at Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil. E-mail: fabricia.petronilho@unisc.br



Stanniocalcin 1 Inhibits the Inflammatory Response in Microglia and Protects Against Sepsis-Associated Encephalopathy

Sandra Bonfante¹ · Larissa Joaquim¹ · Maria Eduarda Fileti¹ · Amanda Della Glustina¹ · Mariana Pereira de Souza Goldim¹ · Lucinéia Gainski Danielski¹ · Evandro Cittadin¹ · Raquel Jaconi De Carli¹ · Bianca Xavier de Farias¹ · Nicole Alessandra Engel¹ · Naiana da Rosa¹ · Jucélia Jeremias Fortunato¹ · Vijayashree Giridharan² · Giselli Scaini² · Gislaine Tezza Rezin¹ · Jaqueline Generoso³ · Rafael Mariano de Bitencourt¹ · Sílvia Terra⁴ · Tatiana Barichello^{2,3} · Fabricia Petronilho^{1,5}

Received: 7 July 2020 / Revised: 10 September 2020 / Accepted: 29 September 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Sepsis-associated encephalopathy is a serious consequence of sepsis, triggered by the host response against an infectious agent, that can lead to brain damage and cognitive impairment. Several mechanisms have been proposed in this bidirectional communication between the immune system and the brain after sepsis as neuroinflammation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. Stanniocalcin-1 (STC-1), an endogen neuroprotective protein, acts as an anti-inflammatory and suppresses superoxide generation through induction of uncoupling proteins (UCPs) in the mitochondria. Here, we demonstrated a protective role of STC-1 on inflammatory responses *in vitro*, in activated microglia stimulated with LPS, and on neuroinflammation, oxidative stress, and mitochondrial function in the hippocampus of rats subjected to an animal model of sepsis by cecal ligation and puncture (CLP), as well the consequences on long-term memory. Recombinant human STC-1 (rhSTC1) suppressed the pro-inflammatory cytokine production in LPS-stimulated microglia without changing the UCP-2 expression. Besides, rhSTC1 injected into the cisterna magna decreased acute hippocampal inflammation and oxidative stress and increased the activity of complex I and II activity of mitochondrial respiratory chain and creatine kinase at 24 h after sepsis. rhSTC1 was effective in preventing long-term cognitive impairment after CLP. In conclusion, rhSTC1 confers significant neuroprotection by inhibiting the inflammatory response in microglia and protecting against sepsis-associated encephalopathy in rats.

Keywords Sepsis · Stanniocalcin-1 · Microglia · Brain

Sandra Bonfante and Larissa Joaquim contributed equally to this work.

Fabricia Petronilho
fabricia.petronilho@unisc.br

¹ Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes (NEUROIMet), Graduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil

² Translational Psychiatry Program, Faillace Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX 77054, USA

³ Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil

⁴ Graduate Program: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

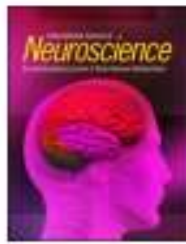
⁵ Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos (NEUROIMet), Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil

Introduction

Sepsis is a debilitating systemic inflammatory process involving multiple organ systems that is preceded by an infection (Singer et al. 2016). Sepsis-associated encephalopathy (SAE) represents a diffuse cerebral dysfunction during sepsis that frequently causes long-term cognitive impairments, including disrupted attention, memory, executive function, and speed of information processing (Barichello et al. 2019).

SAE is probably the most frequent sepsis-related organ dysfunction, affecting up to 70% of patients with sepsis and regularly precedes any other organ involvement (Sonneville et al. 2017). The development of SAE has been associated with higher mortality, lower quality of life in survivors, and long-term neurological sequelae (Prescott and Angus 2018).

In sepsis, peripheral inflammation stimulates the immune system located in the central nervous system (CNS) via



NLRP3 inflammasome activation increases brain oxidative stress after transient global cerebral ischemia in rats

Larissa Silva Joaquim, Lucinéia Gainski Danielski, Sandra Bonfante, Erica Biehl, Khiany Mathias, Tais Denicol, Erick Bagio, Everton Venicius Lazzarin, Richard Simon Machado, Gabriela Costa Bernades, Jaqueline Generoso, Amanda Della Giustina, Tatiana Barichello & Fabricia Petronilho

To cite this article: Larissa Silva Joaquim, Lucinéia Gainski Danielski, Sandra Bonfante, Erica Biehl, Khiany Mathias, Tais Denicol, Erick Bagio, Everton Venicius Lazzarin, Richard Simon Machado, Gabriela Costa Bernades, Jaqueline Generoso, Amanda Della Giustina, Tatiana Barichello & Fabricia Petronilho (2021): NLRP3 inflammasome activation increases brain oxidative stress after transient global cerebral ischemia in rats, *International Journal of Neuroscience*, DOI: [10.1080/00207454.2021.1922402](https://doi.org/10.1080/00207454.2021.1922402)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/00207454.2021.1922402>



Accepted author version posted online: 26 Apr 2021.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 13



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/brb

Sex differences on the behavior and oxidative stress after ketamine treatment in adult rats subjected to early life stress

Helena M. Abelaia^a, Deise Cristina Veron^b, Aíram B. de Moura^a, Anelise S. Carlessi^a,
Laura A. Borba^a, Maria Eduarda M. Botelho^a, Natalia M. Andrade^a, Nicolly S. Martinello^a,
Gabriel C. Zabot^b, Larissa Joaquim^c, Erica Biehl^c, Sandra Bonfante^c, Josiane Budni^b,
Fabrícia Petronilha^a, João Quevedo^{a,c,d,e}, Gislaïne Z. Réus^{a,c}

^a Translational Psychiatry Laboratory, Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina (UNESC), Criciúma, SC, Brazil

^b Experimental Neurology Laboratory, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil

^c Laboratory of Clinical and Experimental Pathophysiology, Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina (UNESC), Tubarão, SC, Brazil

^d Center of Excellence on Mood Disorders, Balluff Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA

^e Neuroscience Graduate Program, The University of Texas MD Anderson Cancer Center UTHealth Graduate School of Biomedical Sciences, Houston, TX, USA

^f Translational Psychiatry Program, Balluff Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Oxidative stress
Interleukin-6
Ketamine
Inflammation
Maternal deprivation
Major depressive disorder

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of ketamine, on behavioral parameters, oxidative stress, and inflammation in the brain of male and female rats submitted to the animal model of maternal deprivation (MD). Wistar rats were deprived of maternal care in the first 10 days of life (three hours daily). As adults, male and female rats were divided: control + saline deprived + saline and deprived + ketamine (15 mg/kg). The behavior was evaluated through the open field and forced swimming tests. Then brain was removed for analysis of oxidative damage, the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and myeloperoxidase (MPO) activity, and levels of interleukin-6 (IL-6). MD induced depressive behavior in males and ketamine reversed these changes. MD induced an increase in lipid peroxidation in males and females, ketamine reversed these effects in males. Protein carbonylation was increased in males and females, with ketamine decreasing such effects. The concentration of nitrite/nitrate increased in males and females, whereas ketamine decreased this in the PFC of males. SOD and CAT activities were decreased in male and female deprived groups and deprived groups treated with ketamine. MPO activity and IL-6 levels increased in males subjected to MD and ketamine reversed this effect. The results suggest that stressful events in early life can induce behavioral, neuroimmune changes, and oxidative stress, however, such effects depend on sex and brain area. Ketamine presents anti-inflammatory and antioxidant properties and could be considered an alternative for individuals who are resistant to classical treatments.

1. Introduction

Major depressive disorder (MDD) is complex, impacts multiple systems in the brain and periphery, and alters emotional and cognitive processes that are integral to healthy daily functioning and quality of life (Allart and Neumaier, 2019). Sex-specific factors have also been identified in the clinical presentation, prevalence, and resiliency of MDD

(Sramek et al., 2016). According to Smoller (2005), the incidence and prevalence of MDD in women are two to three times higher than in men. In men, new-onset rates and 12-month prevalence of MDD remain fairly constant from puberty to old age, but increase in women at puberty and remain higher than in men until menopause (Kessler, 2003). Besides, there is an emerging body of literature that shows women and men differ not only in the rate of MDD but also in the presentation of mood

Abbreviations: MD, maternal deprivation; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; MPO, myeloperoxidase; IL-6, interleukin-6.

* Corresponding author at: Translational Psychiatry Laboratory, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, 88806-000, Brazil.

E-mail address: joao.quevedo@unesc.br (J.Q. Réus).

<https://doi.org/10.1016/j.brainbull.2021.04.021>

Received 7 January 2021; Received in revised form 25 April 2021; Accepted 26 April 2021

Available online 28 April 2021

0304-3940/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.



Folic acid alleviates the blood brain barrier permeability and oxidative stress and prevents cognitive decline in sepsis-surviving rats

Michele Novochadlo^a, Mariana Pereira Goldim^a, Sandra Bonfante^a, Larissa Joaquim^a, Khiany Mathias^a, Kluanne Metzker^a, Richard Simon Machado^a, Everton Lazzarin^a, Gabriela Bernades^a, Erick Bagio^a, Leandro Garbosa^a, Aloir Neri de Oliveira Junior^b, Naiana da Rosa^c, Jaqueline Generoso^d, Jucelia Jeremias Fortunato^a, Tatiana Barichello^{b, c, d, e}, Fabrícia Petronilha^{a, *}

^a Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil

^b Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil

^c Translational Psychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The University of Texas Health Science Center at Houston, McGovern Medical School, Houston, TX, USA

^d Center of Excellence in Mood Disorders, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The University of Texas Health Science Center at Houston, McGovern Medical School, Houston, TX, USA

^e Neuroscience Graduate Program, The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences at Houston, Houston, TX, USA

ARTICLE INFO

Keywords

Sepsis
Blood brain barrier permeability
Oxidative stress
Folic acid

ABSTRACT

Sepsis is a complication of an infection which influences the normal regulation of several organ systems, including the central nervous system (CNS). Evidence points towards inflammation and oxidative stress as major steps associated with brain dysfunction in sepsis. Thus, we investigated the folic acid (FA) effect as an important antioxidant compound on acute brain dysfunction in rats and long term cognitive impairment and survival. Wistar rats were subjected to sepsis by cecal ligation and perforation (CLP) or sham (control) and treated orally with FA (10 mg/kg after CLP) or vehicle (veh). Animals were divided into sham + veh, sham + FA, CLP + veh and CLP + FA groups. Twenty-four hours after surgery, the hippocampus and prefrontal cortex were obtained and assayed for levels of blood brain barrier (BBB) permeability, nitrite/nitrate concentration, myeloperoxidase (MPO) activity, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation and protein carbonyls. Survival was performed during 10 days after surgery and memory was evaluated. FA reduced BBB permeability, MPO activity in hippocampus and pre frontal cortex in 24 h and lipid peroxidation in hippocampus and improves the survival rate after sepsis. Long term cognitive improvement was verified with FA in septic rats compared with CLP + veh. Our data demonstrate that FA reduces the memory impairment in 10 days after sepsis and mortality in part by decreasing BBB permeability and oxidative stress parameters in the brain.

1. Introduction

Sepsis is the most frequent cause of death in intensive care units (ICUs), and it is determined by a systemic inflammatory response associated with an infection (Singer et al., 2016). The central nervous system (CNS) is rapidly damaged during sepsis, causing sepsis-associated encephalopathy (SAE), which is clinically characterized by disorientation, delirium, or coma and is associated with an increased rate of mortality in ICU (Vennart et al., 2016).

The exact mechanisms for brain dysfunction in septic patients are far from clear. Currently, it is known that pathophysiology of SAE involves blood-brain barrier (BBB) disruption, mitochondrial and endothelial dysfunction and disturbances in neurotransmission, as well as impairment of neuronal metabolism and direct cellular damage to the brain (Ostadali et al., 2018a). However, the involvement of oxidative stress is indeed the most tested and proven hypothesis, which may culminate in these pathophysiological events (Rau et al., 2013). In a model of polymicrobial sepsis induced by CLP, oxidative damage occurs in the

* Corresponding author at: Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão 2621-3263, SC, Brazil.

E-mail address: fabricia.petronilha@unisc.br (F. Petronilha).

<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2021.104933>

Received 14 October 2020; Received in revised form 18 March 2021; Accepted 26 May 2021

Available online 29 May 2021

0026-2862/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.