



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MARTINS BACK NETTO

**DISFUNÇÃO COGNITIVA PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS IDOSOS: AVALIAÇÃO
DO ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO CEREBRAL**

TUBARAO
2017

MARTINS BACK NETTO

**DISFUNÇÃO COGNITIVA PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS IDOSOS: AVALIAÇÃO
DO ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO CEREBRAL**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

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

Orientadora: Profa. Fabricia Petronilho, Dra.

TUBARAO

2017



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Disfunção cognitiva pós-operatória em ratos idosos: avaliação
do envolvimento do estresse oxidativo cerebral

MARTINS BACK NETTO

AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 30 de maio de 2017.

Doutora Fabricia Cardoso Petronilho (orientador)

Doutora Talita Tuon (Avaliador externo-UNESC)

Doutora Sílvia Resende Terra (Graduação Unisul)

Doutora Gislaine Tezza Rezin (avaliador interno)

Professor Doutor Jefferson 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 – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621.3100
* Campus Universitário de Tubarão – Av. José Acácio Moreira, 787 – Bairro Dehon – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621.3000
* Campus Universitário da Grande Florianópolis – Av. Pedra Branca, 25 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-270 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279.1000
* Campus Universitário Unisul Virtual – Av. dos Lagos, 41 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-100 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279.1242

Back Neto, Martins, 1980-
B12 Disfunção cognitiva pós-operatória em ratos idosos :
avaliação do envolvimento do estresse oxidativo cerebral /
Martins Back Neto ; -- 2017.
57 f. il. ; 30 cm

Orientadora : Fabricia Petronilho.
Dissertação (mestrado)—Universidade do Sul de Santa
Catarina, Tubarão, 2017.
Inclui bibliografias.

1. Manifestações de doenças neurológicas. 2. Estresse
oxidativo. 3. Distúrbios da cognição. I. Petronilho, Fabricia.
II. Universidade do Sul de Santa Catarina – Mestrado em
Ciências da Saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.84

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha esposa Simony pelo amor, carinho, compreensão e pelo constante apoio e incentivo.

Aos meus filhos Matheus e Leonardo pelo amor, carinho e compreensão.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Fabrícia Petronilho pela atenção, paciência, confiança, apoio e orientação durante a realização de todo o trabalho.

Ao Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos – Neuroimet da UNISUL

Ao grupo de Pesquisa Neurolmet em especial meus amigos e colegas Aloir, Mariana, Maria Eduarda, Khiany, Raquel e Leandro sem os quais não conseguiria executar o projeto.

À Prof^a Dr^a Jucélia Jeremias Fortunato pela sua valiosa colaboração durante a construção do projeto. Agradeço também ao seu Núcleo de Pesquisa pelo auxílio na realização dos testes comportamentais em especial a doutoranda Naiana pelas explicações.

Ao corpo docente do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Sul de Santa Catarina por transmitir o conhecimento necessário para a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Sílvia Resende Terra por suas contribuições durante a qualificação do projeto .

Aos colegas mestrandos Jairo, Diego, Joice, Janaína, Judite, Jane e Christine pelo apoio, incentivo e sugestões durante a pós-graduação.

À Silvane e Franciéli por estarem sempre prestativas.

À todos meu muito obrigado e minha gratidão.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.” John Ruskin.

RESUMO

Introdução: Disfunção cognitiva pós operatória (DCPO) é uma síndrome definida por uma queda no desempenho cognitivo avaliado por um conjunto de testes neuropsicológicos realizados antes e após um procedimento cirúrgico. A etiologia da DCPO ainda é desconhecida mas estudos em animais têm sugerido que a DCPO pode ser causada por: neuroinflamação excessiva após a cirurgia e falha para resolver o processo inflamatório. Associado a isso, sabe-se que o estresse oxidativo como resultado da neuroinflamação pode ser um dos causadores de dano neuronal.

Objetivo: avaliar o possível envolvimento do estresse oxidativo cerebral na DCPO em modelo experimental de fratura em ratos idosos.

Métodos: ratos da linhagem Wistar foram submetidos a um modelo experimental de fratura na tíbia. Os parâmetros bioquímicos foram analisados a partir de amostras do hipocampo e córtex pré-frontal 24 horas e 7 dias após o procedimento. Parâmetros determinados: dano oxidativo em lipídios e proteínas; atividades das enzimas oxidantes (superóxido dismutase-SOD e catalase-CAT). O déficit cognitivo foi avaliado 7 dias após o procedimento através do teste de habituação ao campo aberto e o teste reconhecimento de objetos. As análises estatísticas foram executadas utilizando o programa SPSS® versão 20.0 com resultados significativos para $p < 0,05$, os gráficos construídos no Graphpad Prism® versão 6.

Resultados: O dano em lipídio apresentou um aumento no hipocampo no grupo fratura no sétimo dia pós cirurgia comparado ao grupo controle. O dano em proteínas apresentou valores significativamente maiores no primeiro dia pós cirurgia no grupo fratura tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal. As enzimas antioxidantes SOD e CAT apresentaram uma diminuição significativa de sua atividade em ambas estruturas no primeiro dia pós cirurgia no grupo fratura. Nos testes comportamentais os ratos do grupo controle apresentaram uma diminuição no número de *crossings* o que não ocorreu com o grupo fratura e o grupo fratura apresentou um aumento significativo no número de *rearings* comparado ao grupo controle. No teste de reconhecimento de objetos, o grupo fratura apresentou prejuízo na memória de longa duração.

Conclusão: Conclui-se que em ratos idosos submetidos em modelo experimental de fratura na tíbia ocorreu aumento de estresse oxidativo acompanhado pelo prejuízo na memória de longa duração e na habituação de campo aberto.

Descritores: *Disfunção cognitiva pós-operatória. Estresse oxidativo. Disfunção cognitiva*

ABSTRACT

Introduction: Postoperative cognitive dysfunction (POCD) is a syndrome defined by a drop without cognitive performance assessed by a set of neuropsychological tests before and after a surgical procedure. The etiology of POCD is still unknown but animal studies have suggested that an POCD may be caused by: excessive neuroinflammation following surgery and failure to resolve the inflammatory process. Associated with this, it is known that oxidative stress as a result of neuroinflammation may be one of the causes of neuronal damage. **Objective:** to evaluate the possible cerebral oxidative involvement in POCD in an experimental fracture model in the elderly rats. **Methods:** Wistar rats submitted to an experimental model of tibial fracture. The results obtained are analyzed from samples of the hippocampus and prefrontal cortex 24 hours and 7 days after the procedure. **Parameters determined:** oxidative damage in lipids and proteins; Activities of oxidizing enzymes (superoxide dismutase-SOD and catalase-CAT). Cognitive deficit was assessed 7 days after the procedure by the open field test and the object recognition test. The statistical analyzes were performed using the SPSS® version 20.0 program with significant results for $p < 0.05$, the graphs constructed were not Graphpad Prism® version 6. **Results:** The lipid damage showed an increase in the hippocampus in the fracture group on the seventh postoperative day compared to the control group. Protein damage showed significantly higher values on the first postoperative day in the fracture group in both the hippocampus and the prefrontal cortex. The antioxidant enzymes SOD and CAT showed a significant decrease in their activity in both structures on the first postoperative day in the fracture group. In the behavioral tests the rats of the control group presented a decrease in the number of crossings, which did not occur with the fracture group and the fracture group presented a significant increase in the number of rearings compared to the control group. In the object recognition test, the fracture group presented impairment in long-term memory. **Conclusion:** It was concluded that in elderly rats submitted to an experimental model of fracture in the tibia, there was an increase in oxidative stress accompanied by long-term memory impairment and habituation of the open field.

Keywords: Postoperative cognitive dysfunction. Oxidative stress. Cognitive disorder

LISTA

Lista de abreviaturas

DCPO – Disfunção Cognitiva Pós-Operatória

BHE - Barreira Hematoencefálica

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ERNs - Espécies Reativas de Nitrogênio

SNC - Sistema Nervoso Central

CAM – Método de Avaliação de Confusão (do inglês *Confusion Assessment Method*)

DAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Dano (do inglês *Damage-Associated Molecular Pattern*)

PRRs - Receptores de Reconhecimento Padrão (do inglês *Pattern Recognition Receptors*)

HMGB1 - Proteína do Grupo 1 de Alta Mobilidade (do inglês *High Mobility Group Box 1*)

TLRs - Receptores Toll-like

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

NF-κB - Fator Nuclear Kappa B (do inglês *Nuclear Transcription Factor kappa B*)

TNF-α– Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês *tumor necrosis factor alpha*)

IL-1β – Interleucina- 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-11 – Interleucina 11

IL-18 – Interleucina 18

IL-1 – Interleucina 1

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)

RNI - Intermediários Reativos do Nitrogênio (do inglês *reactive nitrogen intermediate*)

SOD – Superóxido Dismutase

CAT - Catalase

GPx - Glutathione Peroxidase

GSH - Glutathione

MMP - Metaloproteinases de Matriz

UNISUL - Universidade do Sul de Santa Catarina

FT – Fratura na Tíbia

TBARS - Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*)

DBCA - Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais

MDA - malondialdeído

Lista de quadros

Quadro 1 - Características da deterioração cognitiva pós operatória.....	7
Quadro 2 - Fatores de risco na DCPO	8
Quadro 3. Alarminas: origem e funções.....	9

Lista de figuras

Figura 1 - Geração de radicais livres durante a inflamação e sistema enzimático anti-oxidante.....	13
Figura 2 – Delineamento do estudo	23
Figura 3 – Modelo experimental de fratura na tíbia..	23

Lista de gráficos

Gráfico 1 Equivalentes de malondialdeído (MDA) no córtex pré-frontal e no hipocampo em 24 horas e 7 dias após cirurgia no grupo sham e no grupo fratura da tíbia (FT).....	27
Gráfico 2. Proteína carbonilada no córtex pré-frontal e no hipocampo em 24 horas e 7 dias após cirurgia no grupo sham e no grupo fratura da tíbia (FT).....	28
Gráfico 3. Atividade da superóxido dismutase (SOD) no córtex pré-frontal e no hipocampo em 24 horas e 7 dias após cirurgia no grupo sham e no grupo fratura da tíbia (FT).....	28
Gráfico 4. Atividade da catalase (CAT) no córtex pré-frontal e no hipocampo em 24 horas e 7 dias após cirurgia no grupo sham e no grupo fratura da tíbia (FT).....	29
Gráfico 5. Número de <i>crossing</i> (A) e <i>rearings</i> (B) na avaliação da memória de habituação em campo aberto	30
Gráfico 6. Índice de reconhecimento de objetos na memória a curto prazo(A) e longo prazo(B)	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	6
1.1.1 Definição, Epidemiologia e Fatores de Risco da DCPO	6
1.1.2 Fisiopatologia	9
1.1.2.1 Alarminas e processo inflamatório	9
1.1.2.2 Radicais livres, antioxidantes e estresse oxidativo	11
1.1.2.3 Mecanismos de disfunção cerebral associado a DCPO	15
1.1.2.4 Memória e aprendizado	16
1.1.3 Tratamento	19
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 MÉTODOS	21
3.1 TIPO DE ESTUDO	21
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	21
3.3 ANIMAIS	21
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	21
3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS	22
3.5.1 Modelo de fratura de tíbia	22
3.5.2 Dano oxidativo em lipídios e proteínas	23
3.5.3 Atividade das enzimas antioxidantes	24
3.5.4 Quantificação de proteínas	24
3.5.5 Teste comportamentais	24
3.5.5.1 Avaliação da memória de habituação ao campo aberto	25
3.5.5.2 Avaliação da memória de reconhecimento de objetos	25
3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	26
3.7 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	26
4 RESULTADOS	27
4.1 A FRATURA NA TÍBIA GEROU DANO OXIDATIVO CEREBRAL EM LIPÍDEOS E PROTEÍNAS	27
4.2 A FRATURA NA TÍBIA DIMINUIU A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES CEREBRAL	28

4.3 A FRATURA NA TÍBIA GEROU UM PREJUÍZO NA MEMÓRIA DE HABITUAÇÃO E NA MEMÓRIA DE LONGO PRAZO	29
5 DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXO A – Parecer Aprovação Comitê de Ética.....	47

1. INTRODUÇÃO

Disfunção cognitiva pós operatória (DCPO) é uma síndrome definida por uma queda no desempenho cognitivo avaliado por um conjunto de testes neuropsicológicos realizados antes e após um procedimento cirúrgico¹. Os testes neuropsicológicos para DCPO normalmente incluem testes que avaliam vários domínios cognitivos: função executiva; aprendizado e memória; função visual e espacial; e função psicomotora¹.

Os idosos, especialmente, estão em maior risco para apresentar a DCPO². As alterações fisiológicas decorrentes do envelhecimento resultam em uma capacidade reduzida do idoso para lidar com o estresse associado a cirurgia, anestesia e internação em geral².

A incidência relativamente alta de DCPO é encontrada após procedimentos cardíacos e ortopédicos². No geral, a longa duração da cirurgia e procedimentos grandes e invasivos com a perda de sangue relevantes são acompanhados com um risco aumentado em comparação com intervenções menos invasivas, pequenas e curtas².

Em relação aos pacientes ortopédicos alguns fatores são sugeridos na gênese da DCPO como complicações tromboembólicas, influência da terapia medicamentosa para dor no período pós operatório, a imobilização prolongada resultantes de fraturas dos ossos longos³. A DCPO após cirurgias não cardíacas está associada com aumento da mortalidade, diminuição da qualidade de vida, risco de abandono precoce ao mercado de trabalho e aumento da dependência física⁴.

A etiologia da DCPO ainda é desconhecida⁵. Os procedimentos cirúrgicos causam uma resposta de estresse sistêmico, o que leva à liberação de hormônios neuroendócrinos e uma resposta inflamatória⁵. Estudos em animais têm sugerido que a DCPO pode ser causada por: neuroinflamação excessiva após a cirurgia; falha para resolver o processo inflamatório; disfunção da barreira hematoencefálica (BHE)⁶⁻¹².

A neuroinflamação proporciona uma fonte primária de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) a partir da ativação do sistema imune do sistema nervoso central (SNC)¹³. Estas espécies apresentam capacidade para modificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos¹³. Os neurônios, são altamente vulneráveis aos efeitos prejudiciais destas espécies reativas¹³. A sus-

cetibilidade do SNC a ação das espécies reativas ocorre devido à sua elevada taxa metabólica, rica composição de ácidos graxos com tendência para a peroxidação, altas concentrações intracelulares de metais de transição capazes de catalisar a formação de EROs e baixos níveis de anti-oxidantes¹³.

Mecanismos, incluindo humoral, celular, e vias neurais, têm sido propostos nesta comunicação bidirecional entre o sistema imunitário e o cérebro após a cirurgia¹. Estratégias destinadas a diminuir e/ou controlar a resposta inflamatória excessiva têm sido promissoras em limitar o declínio cognitivo induzido por cirurgia em vários modelos de roedores. Entretanto nenhum estudo avaliou o possível envolvimento do estresse oxidativo cerebral na DCPO em ratos idosos em modelo experimental de fratura na tíbia. Portanto compreender as relações entre a DCPO, formação de espécies reativas, a capacidade antioxidante é fundamental para elucidar os mecanismos da doença e o desenvolvimento de modalidades terapêuticas para combater o seu processo.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Definição, Epidemiologia e Fatores de Risco da DCPO

Confusão pós-operatória e problemas cognitivos são mais comuns em idosos (>65 anos) do que pacientes mais jovens e podem ser categorizados como delírio pós-operatório, DCPO e demência¹⁴. O delírio é bem definido pela Organização Mundial de Saúde e é encontrado na Classificação Internacional de Doenças^{15,16}. É caracterizado por um início agudo e pode estar associado com alteração no nível de consciência. Pode manifestar-se como hiperatividade, hipoatividade ou ambas, tipicamente com sonolência diária e agitação noturna^{15,16}.

Embora o delírio seja normalmente uma condição temporária, é independentemente associado com aumento da mortalidade, tempo de hospitalização, incapacidade funcional, a permanência em instituições de cuidados a longo prazo, e os custos de hospitalização¹⁷. Há uma série de ferramentas de avaliação rápida usadas para diagnosticar delírio em pacientes hospitalizados. Destes, o método de avaliação de confusão (CAM) é o mais conhecido e mais utilizado pelos médicos. O CAM avalia as seguintes características: início agudo e curso flutuante; desatenção; pensamento

desorganizado; e alteração do nível de consciência. O diagnóstico de delírio requer a presença das duas primeiras características e/ou terceira ou quarta¹⁸.

Apesar do fato da DCPO não ser um diagnóstico psiquiátrico formal, por não estar na Classificação Internacional de Doenças, o termo é comumente usado na literatura e é considerado como sendo uma disfunção cognitiva leve¹⁹. Afeta uma grande variedade de domínios cognitivos, aprendizagem e memória, habilidades verbais, percepção, atenção, funções executivas e pensamento abstrato. É possível ter alteração em uma área sem déficit em outra^{20,21}. A principal queixa subjetiva é a deterioração na memória, e alguns pacientes apresentam dificuldade para atividade laboral²². Nenhum teste específico está aceito internacionalmente para diagnosticar DCPO²¹. A DCPO, normalmente não é aparente durante os primeiros dias após a cirurgia e em muitos casos não é detectado até que o paciente ou os familiares percebam novas dificuldades com as atividades da vida diária. Os sintomas podem durar de semanas a alguns meses mas usualmente são reversíveis, normalmente a consciência está preservada (Quadro 1)²³.

Fischer e colaboradores²⁴ recomendam quando suspeitar da DCPO, centrar-se na anamnese. Parentes ou outros acompanhantes que conheçam bem o paciente representam fontes importantes para a elaboração da história clínica. Deve ser programado um tempo necessário para uma completa avaliação da função cognitiva seguida de um exame físico e neurológico.

Quadro 1. Características da deterioração cognitiva pós operatória

Características	Delírio	DCPO
Início	Agudo	Sutil
Duração	Dias a semanas	Semanas a meses
Atenção	Prejudicada	Prejudicada
Consciência	Alterada	Normal
Reversível	Usualmente	Usualmente, mas pode ter longa duração

DCPO: Disfunção Cognitiva Pós Operatória

Fonte: Adaptado Krenk e cols²⁵

O primeiro estudo grande prospectivo descrevendo DCPO em cirurgias não cardíaca foi publicado em 1998 por um grupo de pesquisa multinacional²⁶. Neste estudo, pacientes com 60 anos ou mais de idade, que foram submetidos a cirurgia abdominal e ortopédica, completaram uma bateria de testes psicométricos uma semana antes da cirurgia e três meses após a cirurgia. A disfunção cognitiva ocorreu em 25% dos pacientes na alta hospitalar e 10% tinham alterações cognitivas mensuráveis aos três meses após a cirurgia. Encontrou-se diferenças estatisticamente significativas na incidência de disfunção cognitiva entre os pacientes cirúrgicos e os controles não ci-

rúrgicos em uma semana e três meses após a cirurgia. Entretanto não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na incidência de DCPO em pacientes comparados aos controles não-cirúrgicos em um ano após a cirurgia. Em um estudo de coorte prospectivo, no entanto, uma maior disfunção cognitiva foi observada em pacientes cirúrgicos do que os controles não-cirúrgicos, mesmo em um ano após a cirurgia²⁷. Monk e colaboradores¹⁴ avaliaram adultos de todas as idades submetidos a cirurgia não cardíaca e diagnosticaram DCPO em 30-40% dos pacientes adultos de todas as idades no momento da alta hospitalar.

A incidência relativamente alta de DCPO é encontrada após procedimentos ortopédicos². A incidência de DCPO após artroplastia de grandes articulações varia de 16% a 45%²⁸. Em pacientes com fratura de quadril a incidência varia de 16% a 62%²⁹.

Alguns fatores de risco são sugeridos na gênese da DCPO em pacientes ortopédicos, como: complicações tromboembólicas; influência da terapia medicamentosa para dor no período pós operatório; a imobilização prolongada resultantes de fraturas dos ossos longos³. Os fatores de risco para o desenvolvimento da DCPO podem ser divididos em fatores modificáveis e fatores não modificáveis (Quadro 2)¹. Um fator de risco não modificável para DCPO consistentemente encontrada em vários estudos é a idade aumentada^{14,26,30-32}. Outro estudo, comparando pacientes acima e abaixo de 60 anos, encontrou que a DCPO estava mais de duas vezes, mais frequente em pacientes acima 60 anos¹⁴.

Quadro 2. Fatores de risco na DCPO

Fatores modificáveis	Fatores não modificáveis
Anestesia (tipo, duração)	Aumento da idade
Hospitalização (duração)	Nível escolaridade baixo
Cirurgia (duração, tipo)	Acidente vascular cerebral prévio

DCPO: disfunção cognitiva pós operatória

Fonte: Berger e cols¹

Apesar de alguns fatores estarem associados a DCPO, a etiologia ainda é desconhecida. Mas sabe-se que os procedimentos cirúrgicos causam uma resposta de estresse sistêmico, o que leva à liberação de hormônios neuroendócrinos e uma resposta inflamatória causando alterações no SNC⁵.

1.1.2 Fisiopatologia

1.1.2.1 Alarminas e processo inflamatório

O trauma nos tecidos bem como o trauma decorrente da cirurgia liberam padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) também chamados de alarminas^{33,34}. Estes, por sua vez são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que desencadeiam uma resposta imune^{33,34}.

As alarminas compreendem moléculas endógenas multifuncionais que são passivamente liberadas a partir de células necróticas após infecção ou lesão tecidual ou são secretadas por leucócitos e epitélios estimulados³⁵. Uma vez liberada extracelularmente, as alarminas promovem a ativação de células imunitárias inatas^{36–38}. Recrutam e ativam células apresentadoras de antígenos envolvidos na defesa do hospedeiro e a reparação de tecidos através de PRRs^{36–38}.

Uma das mais importantes DAMPs é a proteína do grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1) vide Quadro 3, Alarminas e funções³⁵. HMGB1 pode ligar e sinalizar através de uma família de PRRs que são evolutivamente conservadas³⁹. Entre PRRs, receptores Toll-like (TLRs) são de importância crítica, reconhecendo vários ligantes e ativação de sinais de TLR ao longo de diferentes percursos⁴⁰. Um desses percursos transduzem sinais intracelulares, em última análise conduzindo à ativação do fator nuclear kB (NF-kB) que aumentam a liberação de citocinas pró-inflamatórias⁴¹.

Quadro 3. Alarminas: origem e funções

Alarina	Origem	Ação Intracelular	Ação Extracelular
HMGB1	Todos tipos celulares incluindo células imunológicas	Regulação da transcrição do DNA	Resposta pró-inflamatória; quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células precursoras do sistema imune; angiogênese
S100A8/S100A9, S100A12	Células epiteliais e fagócitos	Regulação de cálcio, motilidade celular	Resposta pró-inflamatória; adesão neutrófilo, migração das células da medula óssea.
S100B (S71)	Astrócitos, oligodendrócitos, células de Schwann	Regulação da proliferação celular, diferenciação, homeostase de cálcio, transcrição, motilidade	Pró-proliferação, pró-diferenciação
HSP60 e HSP70	Todas células (HSP60: mitocôndria; HSP70: citosol e núcleo)	Formação de estruturas proteicas multimericas e cadeias de polipeptídeos nascentes	Estimulam autoantígenos de vias imunorregulatórias para suprimir a inflamação; podem associados a outros ligantes regular a liberação de citocinas pró-inflamatórias

HMGB1: proteína do grupo 1 de alta mobilidade; DNA: ácido desoxirribonucleico

Fonte: Adaptado Chan e cols³⁵

Outras importantes alarminas são S100A8 e S100A9, abundantes no citosol de neutrófilos e monócitos, são também mediadores de inflamação⁴². Estes complexos são liberados durante a ativação de fagócitos e medeiam os seus efeitos através dos receptores TLRs, levando à produção de TNF- α (fator de necrose tumoral *alfa*) e outras citocinas⁴³.

O pico da resposta inflamatória após um trauma ortopédico inicia dentro das primeiras 24 horas⁴¹. A resposta inicial pró-inflamatória envolve a secreção de TNF- α , interleucina 1 *beta* (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-11 (IL-11) e interleucina-18 (IL-18)⁴². A concentração de TNF- α apresenta pico nas primeiras 24 horas e retorna aos valores basal dentro das 72 horas pós trauma⁴². 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 osteoprogenitoras⁴³.

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 lesionado⁴⁷⁻⁴⁹. A IL-6 é somente produzida na fase aguda e estimula a angiogênese, a produção do fator de crescimento endotelial e a diferenciação de osteoblastos e osteoclastos⁴⁷⁻⁴⁹. Como resultado, o hematoma da fratura inicial e a subsequente cascata inflamatória aguda são substituídas por tecido de granulação rico em proliferação de células mesenquimatosas e o desenvolvimento de neovascularização incorporado numa matriz desorganizada extracelular de colágeno que resultará na consolidação da fratura⁵⁰⁻⁵².

Logo a inflamação é um processo biológico fundamental para a erradicação dos agentes patogênicos e manutenção da homeostase dos tecidos⁵³. O estímulo inflamatório é acompanhado de citocinas e de reparação para resolver o meio inflamatório e restabelecer a homeostase dos tecidos⁵³. No entanto, se esta progressão de eventos persiste o processo pode progredir para um estado de inflamação crônica⁵⁴. Esta resposta inflamatória aumentada é realçada pela secreção contínua de citocinas e outros fatores, como a destruição do tecido em curso, e a homeostase é prejudicada⁵⁵. A lesão óssea induz uma resposta inflamatória que é benéfica para a cicatrização quando aguda e altamente regulada⁵⁵. No entanto, se esta resposta é suprimida, desregulada, ou se tornar crônica, a inflamação pode ser prejudicial para a cura⁵⁴⁻⁵⁶.

O processo de envelhecimento é acompanhado do aumento na fragilidade física e mental produzindo um risco elevado de estresse físico e psicológico nos

idosos⁵⁷. O estresse é um potente modulador da função imunitária, que na juventude pode ser compensada pela presença de uma resposta imunitária eficiente⁵⁷. Nos idosos, a resposta imune é diminuída, como resultado do declínio nos vários componentes do sistema imune (senescência imune) e um deslocamento para um estado pró-inflamatória crônico⁵⁷.

Além da produção de mediadores inflamatórios, a presença de alarminas está relacionada na produção de radicais livres e aumento do dano oxidativo celular⁵⁸. Por serem reconhecidos por receptores específicos em neutrófilos, induzem a produção de EROs via ativação de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) oxidase⁵⁸.

1.1.2.2 Radicais livres, antioxidantes e estresse oxidativo

O termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica⁵⁹. É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas⁶⁰. Os radicais livres são gerados em processos aeróbicos, como a respiração celular, a exposição a infecções microbianas que envolvem a ativação de fagócitos, durante a atividade física intensa ou a ação de poluentes / toxinas como fumaça de cigarro, álcool, ionizantes e radiações ultra violeta (UV), pesticidas, ozônio⁶¹. As EROs e as ERNs são geradas durante o metabolismo normal, mas a produção está aumentada na presença de hipóxia ou isquemia, lesão tecidual, infecção e inflamação⁶². Particularmente nos tecidos onde ocorre uma fratura, devido ao mecanismo de isquemia e reperfusão é gerado radicais livres⁶³⁻⁶⁵.

As EROs são representados por radicais livres e não-livres, moléculas de radicais oxigenados, tais como peróxido de hidrogénio (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxigénio singlet (1O_2), o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e o radical hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$)⁶⁶. O $O_2^{\cdot-}$ ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos⁶⁷. O $HO_2^{\cdot}$, a forma prolongada do $O_2^{\cdot-}$, é mais reativo que este, por sua maior facilidade em iniciar o dano de membranas biológicas⁵⁹. O H_2O_2 apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados, é um metabólito do oxigénio extremamente deletério pois participa da reação que produz o $OH^{\cdot}$. O 1O_2 , assim como o H_2O_2 não possui elétrons desemparelhados, no entanto também reage com um grande número de moléculas^{60,67}. O $OH^{\cdot}$ é

o mais reativo em sistemas biológicos pois não existe mecanismo de eliminação enzimático específico para ele ⁶⁷.

Dentre as ERNs, o óxido nítrico ($\text{NO}^\cdot$) e dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^\cdot$) apresentam elétrons desemparelhados, e, portanto, podem ser considerados como radicais livres, diferentemente do óxido nitroso (N_2O)⁶⁸. O óxido nítrico endógeno, sintetizado a partir de L-arginina, de oxigênio e de NADPH, por enzimas que pertencem à classe de sintase de óxido nítrico ou por redução de nitrato inorgânico, é uma das moléculas de sinalização envolvidas na vasodilatação e neurotransmissão⁶⁸. O óxido nítrico também é liberado pelos fagócitos (monócitos, macrófagos e neutrófilos), como resultado da reação do sistema imune⁶⁹⁻⁷¹. 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 biológicas⁶⁹⁻⁷¹. O $\text{ONOO}^\cdot$ pode ser decomposto para produzir radicais $\text{OH}^\cdot$, independentemente da presença de metais de transição⁶⁹⁻⁷¹.

Os radicais livres são produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos⁷². Uma destas organelas é a mitocôndria responsável pelo aproveitamento da maior parte da energia livre provinda da oxidação dos nutrientes, para isso há necessidade do funcionamento do ciclo de Krebs, do fluxo de elétrons na cadeia transportadora e da ação da fosforilação oxidativa⁷³.

Além disso os radicais são gerados a partir de dois sistemas enzimáticos: o sistema oxidativo de $\text{NADP}^+/\text{NADP}^+\text{H}^+$ e o da mieloperoxidase. Sua fonte principal de produção é a explosão respiratória durante a ativação de glóbulos brancos como neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, entre outros⁷⁴.

Para evitar os danos causados pelas espécies reativas, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa denominados de antioxidantes. O conceito de antioxidante biológico refere-se a qualquer composto que, quando presente a uma concentração mais baixa comparada com a de um substrato oxidável, é capaz de atrasar ou evitar a oxidação do substrato^{75,76}. Os antioxidantes podem atuar em diferentes etapas do processo oxidativos podendo interferir na iniciação, propagação ou na terminação da cadeia de geração de radicais livres (figura 1)⁷⁷.

A superóxido dismutase (SOD) faz parte do sistema de defesa antioxidante enzimática contra a oxidação, fazendo a dismutação do ânion radical superóxido em oxigênio e H_2O_2 ^{78,79}. Três tipos de SODs podem ser encontradas em tecidos de mamíferos: superóxido dismutase contendo cobre-zinco (SOD1) presente no citosol, superóxido dismutase contendo manganês (SOD2) encontrada na matriz mitocondrial e superóxido-dismutase extracelular (SOD3)^{78,79}.

A catalase (CAT) representa a enzima antioxidante envolvida na depleção reductiva de H_2O_2 à água. É expressa na maioria das células, órgãos e tecidos e em concentrações elevadas, no fígado e eritrócitos⁷⁹. A glutathiona peroxidase (GPx), uma enzima antioxidante contendo selênio, catalisa tanto a redução de H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos a água ou os álcoois correspondentes⁸⁰.

O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutathiona (GSH), principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina)⁸¹. Os metais de transição são potenciais formadores de espécies reativas através da reação com outros compostos, uma vez que sofrem reações redox. Decorre, daí, a necessidade de serem transportados associados a proteínas, impedindo que essas reações ocorram⁸¹.

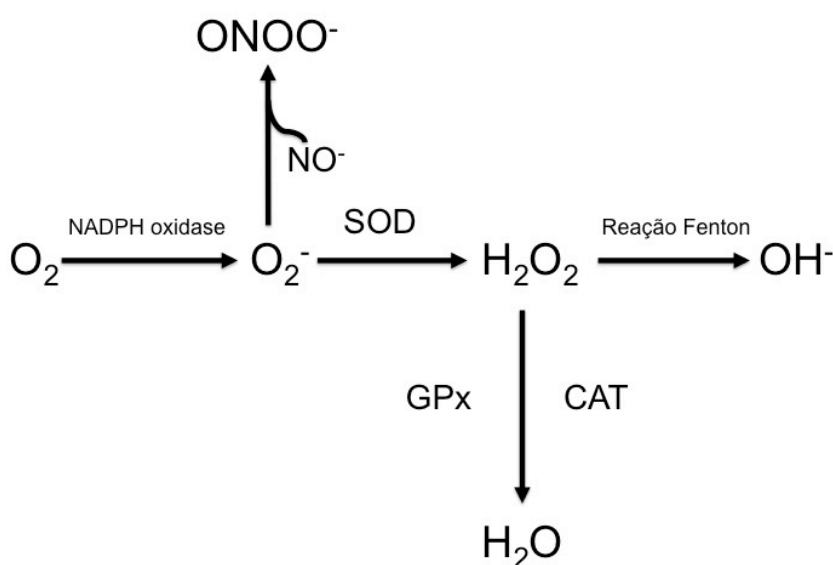


Figura 1 – Geração de radicais livres durante a inflamação e sistema enzimático antioxidante. O O_2 sobre a ação da NADPH oxidase gera o O_2^- , este por sua vez na presença de NO^- pode gerar o

ONOO⁻. Outra via para o O₂ é a dismutação para H₂O₂ pela SOD. O H₂O₂ pode ser catalisado em H₂O pela GPx ou pela CAT, ou ainda na presença de íons metálicos gerar a OH⁻ na reação de Fenton.

O₂⁻ - radical superóxido; H₂O₂ – peróxido de hidrogênio; OH⁻ radical hidroxil; H₂O – água; SOD – superóxido dismutase; CAT – catalase; GPx – glutathione peroxidase; ONOO⁻ - peroxinitrito; NO⁻ - óxido nítrico; O₂ – oxigênio; NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

O estresse oxidativo portanto ocorre com a falta de equilíbrio entre a produção de EROs / ERNs e a capacidade do organismo para neutralizar a sua ação pelos sistemas de proteção antioxidante⁸². Tal desequilíbrio podem danificar lípidos, proteínas, DNA e hidratos de carbono e alterar a estrutura celular e as funções do organismo^{83,84}.

Os lípidos são os mais susceptíveis a sofrerem oxidação: ácidos graxos polinsaturados, em particular o ácido aracdônico e ácido docosa-hexaenóico, resultam na formação de malondialdeído e 4-hidroxinonenal, reconhecidos marcadores de deterioração oxidativa dos lípidos. EROs e ERNs adicionalmente são capazes de oxidar proteínas, que, subsequentemente geram carbonilas. Ácidos nucleicos também sofrem danos pelas EROs, podendo provocar quebra na cadeia e alteração em purinas e bases de piridina, levando a mutações no DNA⁸⁵.

Pfeifer e colaboradores⁸⁶, avaliaram a resposta inflamatória em ratos submetidos a trauma em tecidos moles, e observou a elevação da atividade da mieloperoxidase nos pulmões destes ratos em relação ao grupo controle. Menzel e colaboradores⁸⁷, avaliaram a resposta inflamatória em camundongos submetidos a fratura de femur e também constataram o aumento da atividade da mieloperoxidase nos pulmões. A MPO é liberada a partir de leucócitos ativados em locais inflamatórios, gerando espécies reativas⁸⁸.

Wang e colaboradores⁸⁹ investigaram os níveis de estresse oxidativo em pacientes com fraturas de ossos longos que foram divididos em dois grupos: pacientes abaixo de 50 anos e pacientes acima de 65 anos. Constataram o aumento da peroxidação lipídica, a partir de coleta sanguínea, significativamente maior no grupo de pacientes idosos e também um aumento (2,2 vezes) dos níveis basais da SOD no grupo idoso. Entretanto somente o grupo abaixo de 50 anos teve um aumento significativo da SOD após a realização da cirurgia.

Assim sabe-se que o estresse oxidativo associado a resposta inflamatória periférica desencadeada pelo trauma podem causar o dano as células endoteliais da ba-

reira hematoencefálica (BHE), deixando o cérebro suscetível aos mediadores inflamatórios e células ativadas da periferia⁹.

1.1.2.3 Mecanismos de disfunção cerebral associado a DCPO

A BHE é uma estrutura vascular multicelular que separa o sistema nervoso central (SNC) da circulação sanguínea periférica. É uma estrutura especializada do SNC que controla e regula a homeostase cerebral, medula espinhal, líquido cefalorraquidiano com o resto dos sistemas^{90,91}. Fisiologicamente, as células endoteliais da BHE formam uma rede intercelular contínua de junções apertadas que podem ser degradadas pela ação das metaloproteinases de matriz (MMP)^{12,92}. A BHE tem como função a proteção do cérebro de toxinas e agentes patogênicos, mantendo um ambiente que permite que os neurônios funcionem corretamente⁹³. Além das funções de permeabilidade seletiva a BHE possui aspectos importantes como função neuroimune, incluindo a secreção de citocinas, protaglandinas e óxido nítrico⁹³.

As MMP são enzimas da família de proteases dependentes de zinco, normalmente encontradas em sua forma inativa⁹⁴. Estudos mostram que a atividade das MMPs pode ser aumentada pela presença de citocinas pró-inflamatórias e pelas EROs e ERNs^{95,96}. Como a regulação e ativação da expressão das MMP são complexas e bem controladas a perda dessa homeostase leva a degradação da lâmina basal e das junções apertadas da BHE⁹⁷. Dessa forma se permite que circulem substâncias neurotóxicas assim como mediadores inflamatórios para o parênquima cerebral, levando a ativação microglial e astrócitária. Este estado inflamatório cerebral além de mantenedor da alteração da BHE leva a um déficit da composição de neurotransmissores e ocasiona a degeneração neuronal^{98,99}.

EROs derivadas de microglias, tais como O_2^- não conseguem atravessar eficientemente as membranas celulares e, portanto, pouco provável que tenham acesso aos neurônios e desencadear em eventos tóxicos intraneurais¹⁰⁰. No entanto, O_2^- pode reagir rapidamente com NO^+ no espaço extracelular para formar $ONOO^-$, que pode facilmente atravessar as membranas celulares e causar danos intracelulares¹⁰¹. O NO^+ é produzido em muitos tecidos, incluindo neurônios, astrócitos, microglia e, e pode ser secretada pelas células gliais na ativação com citocinas pró-inflamatórias¹⁰². O NO^+ sozinho tem uma capacidade relativamente baixa de neurotoxicidade. No entanto, em conjunto com o O_2^- , que de forma aditiva contribuem para a destruição neuronal.

ERNs têm sido associadas com o rompimento da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, peroxidação lipídica, danos ao DNA, e a nitração de proteínas¹⁰³.

Assim uma indicação da neuroinflamação é a ativação da microglia. Este fenômeno pode ter uma ação pró ou anti-neurogênica a depender do resultado global do equilíbrio das ações pró e anti-inflamatórias das moléculas secretadas¹⁰⁴. É amplamente aceito que a ativação aguda da microglia, juntamente com citocinas pró-inflamatórias secretadas como IL-6, TNF- α e IL-1 β têm a capacidade de suprimir a neurogênese in vitro^{105–107}. O processo neurogênico inclui uma série de passos desde a proliferação, a migração, a sobrevivência, e finalmente integração dos neurônios recém-formados no circuito do SNC¹⁰⁸.

O hipocampo tem alta densidade dos receptores de IL-1 β , embora a IL-1 β seja necessária para a aprendizagem normal e processos de memória, níveis mais altos também podem produzir diminuição da função^{109,110}. Adicionalmente, a prevalência relativa de receptor TNF- α sobre o endotélio do hipocampo pode explicar a vulnerabilidade a sinalização de citocinas¹¹¹. O trauma cirúrgico em modelos animais está associado com a ativação microglial persistente que são capazes de manter níveis elevados de IL-1 β , e de outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α . Estas alterações estão correlacionadas com disfunção cognitiva visto em modelos animais em testes de memória e aprendizado^{34,112,113}. Pacientes também apresentam uma resposta neuroinflamatória como consequência a uma cirurgia periférica, com uma inicial liberação de citocinas pró-inflamatórias, bem como a liberação de espécies reativas^{39,114,115}. Terrando e colaboradores⁷ mostraram que através de 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 murino.

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 mesmos. Bem como alterações na arborização dendrítica destes neurônios e redução das funções do hipocampo como aprendizado e memória¹¹⁶.

1.1.2.4 Memória e aprendizado

Diversas linhas de evidência indicam que a neurogênese desempenha um papel importante na aprendizagem, memória e plasticidade neural^{117,118}. Memória é a

aquisição, a formação, a conservação e a evocação de uma informação. A aquisição é também chamada de aprendizagem: só se grava aquilo que foi aprendido. A evocação é também chamada de recordação, lembrança, recuperação. Só lembra-se aquilo que se gravou, aquilo que foi aprendido¹¹⁹.

A aquisição diz respeito ao momento em que a informação chega até o SNC e se dá por meio das estruturas sensoriais, as quais transportam a informação recebida até o cérebro. O estímulo atinge os órgãos receptores, o qual, através dos nervos sensitivos, chega ao sistema nervoso central¹²⁰. A consolidação refere-se ao momento de armazenar a informação. Esse armazenamento acontece de duas maneiras distintas: através de alterações bioquímicas ou através de fenômenos eletrofisiológicos. Nos fenômenos eletrofisiológicos, ao tentar-se memorizar uma situação nova, determinados conjuntos de neurônios continuam disparando durante alguns segundos, re-tendo temporariamente a informação somente durante o tempo em que a mesma é necessária, extinguindo-a logo em seguida. Esse tipo de fenômeno tem duração extremamente efêmera e não forma traços bioquímicos. É isso o que ocorre na memória sensorial e na memória de trabalho ou memória operacional¹²¹.

Os fenômenos bioquímicos, também chamados de traços de memória, incluem dois tipos de alterações: as estruturais ou morfológicas e as funcionais, que ocorrem, ambas, nos circuitos neurais. As alterações estruturais compreendem a formação de novas espinhas dendríticas, as quais permitem que um determinado neurônio receba mais aferências de outros neurônios, ou então a formação de novos prolongamentos axonais, os quais permitem que um dado neurônio transmita mais sinais para os neurônios com os quais ele se conecta. Podem ocorrer ainda alterações morfológicas que criam novos circuitos que anteriormente não existiam. Finalmente, no caso das alterações funcionais, são formados novos canais iônicos ou novas proteínas sinalizadoras, que otimizam a transmissão sináptica¹²².

Existem algumas formas de memória, como memória sensorial a qual nos permite reter as informações que chegam até nós através dos sentidos, podendo ser estímulos visuais, auditivos, gustativos, olfativos, táteis ou proprioceptivos. Caracteriza-se por ter curtíssima duração, caso o estímulo não seja recuperado¹²³.

Existe um tipo de memória que serve para armazenar informações e sobretudo, para contextualizar o indivíduo e para gerenciar as informações que estão transitando pelo SNC, denominada de memória de trabalho. A duração da memória de tra-

balho é ultrarrápida porque ela permite armazenar uma informação apenas enquanto está se fazendo uso dessa mesma informação¹²³.

A memória também pode ser denominada de curta duração, que resiste poucas horas. E outra que persiste o suficiente para que se possa formar a memória de longa duração também chamada memória remota durando dias, anos ou décadas¹¹⁹. A memória de longa duração pode ser didaticamente dividida em duas categorias principais: memória declarativa ou memória explícita, que corresponde às memórias que estão prontamente acessíveis à consciência e que podem ser evocadas através de palavras; memória não declarativa ou memória implícita, que correspondem às memórias que estão em nível subconsciente, não podendo ser evocadas por palavras, mas sim por ações¹²⁴. No grupo das memória não declarativa inclui os condicionamentos, as memórias motoras e o priming (tipo de memória induzida por pistas ou dicas)¹²³.

Muitas partes do SNC participam na aquisição das memórias. A memória de trabalho depende da atividade elétrica de neurônios do córtex pré-frontal, localizado na frente da área motora, e não persiste além disso. Quando cessa a ativação dos neurônios pré-frontais, a memória de trabalho também cessa¹²⁵. A memória de curta duração é um processo mnemônico desenvolvido no hipocampo e no córtex entorrinal, utilizando mecanismos em boa parte próprios e independentes das memórias de longa duração que ao mesmo tempo estão sendo geradas¹²⁶. A memória de longa duração é consolidada no hipocampo¹²⁶.

O hipocampo é uma região filogeneticamente antiga do córtex temporal. Tem várias funções, a principal é formar e evocar memórias e também induzir o resto do córtex cerebral, a começar pelo córtex mais próximo a ele, a fazer o mesmo. O córtex entorrinal é uma das regiões corticais que rodeiam o hipocampo. Tem sido visto como um núcleo de rede de memória cortical porque possui conexões recíprocas com o hipocampo^{127,128}.

Neuroplasticidade é a capacidade do cérebro ou de estruturas cerebrais para se adaptar em resposta a estímulos intrínsecos ou extrínsecos, tais como mudanças no meio ambiente, desenvolvimento ou lesões e consiste no princípio de uma interação recíproca entre a estrutura neural e função.¹²⁹ A plasticidade neural pode ocorrer em vários níveis funcionais e estruturais de alterações na excitabilidade da membrana, a plasticidade sináptica, a mudanças na estrutura dendrítica e axonal¹²⁹. Mecanismos de neuroplasticidade no hipocampo subjacentes às funções cognitivas são

também sujeitos ao processo de envelhecimento. Sugere-se que os mecanismos de neuroplasticidade são particularmente vulneráveis durante o envelhecimento¹³⁰.

Logo inflamação periférica ou a sua resposta através da formação de radicais livres podem afetar profundamente a função do SNC incluindo a memória e aprendizado^{34,112,131}. Considerando o dano oxidativo gerado pelas fraturas e a sua possível resposta sobre o SNC, considerou-se a hipótese da ocorrência deste em nível cerebral e sua contribuição na DCPO a partir de modelo experimental de fratura.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento do estresse oxidativo cerebral no desenvolvimento da DCPO em ratos idosos submetidos a um modelo experimental de fratura da tíbia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o dano oxidativo em lipídios e proteínas no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos idosos em 24 horas e 7 dias após serem submetidos ao procedimento cirúrgico de fratura de tíbia;
- Determinar os níveis das enzimas superóxido dismutase e catalase no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos idosos em 24 horas e 7 dias após serem submetidos ao procedimento cirúrgico de fratura de tíbia;
- Analisar o comportamento de memória e aprendizado de ratos idosos em 7 dias após serem submetidos ao procedimento cirúrgico de fratura de tíbia.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo tem caráter pré-clínico.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os reagentes utilizados para as análises bioquímicas foram: ácido tiobarbitúrico, dinitrofenilhidrazina, epinefrina, catalase de fígado bovino, hidroperoxido de tert-butila, albumina bovina, glutathione (Sigma, St. Louis, MO), ácido tricloroacético, peróxido de hidrogênio, glicina, (Labsynth, São Paulo, Brazil). No que se refere aos equipamentos, as análises de dano em lipídios, proteínas, SOD e CAT foi utilizado o Espectrofotômetro (U2010, Hitachi) (Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos- UNISUL).

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados um total de 40 ratos machos da linhagem Wistar de 8 meses de idade (360–465 g) em que segundo Andersen¹³² são considerados idosos, fornecidos pelo Biotério da Universidade do Extremo Sul de Santa Catarina (UNESC). Todos os animais foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e livre acesso à água e alimento no Biotério da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL).

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Os animais foram divididos em dois grupos de forma aleatória, tendo ao final da divisão dois grupos com 18 animais grupo sham e 22 animais no grupo fratura. Ambos grupos sham foi subdivididos em dois subgrupos, um para as análises bioquímicas em 24 horas e o outro grupo para análise bioquímicas e testes comportamentais em 7 dias conforme figura 2. Os animais foram submetidos a eutanásia assistida por overdose de tiopental após 24 horas e 7 dias tempo esse que segundo Lu et al¹³³

mostraram um aumento da reposta inflamatória no hipocampo. O hipocampo e córtex pré-frontal foram dissecados para avaliação dos parâmetros bioquímicos¹³⁴.

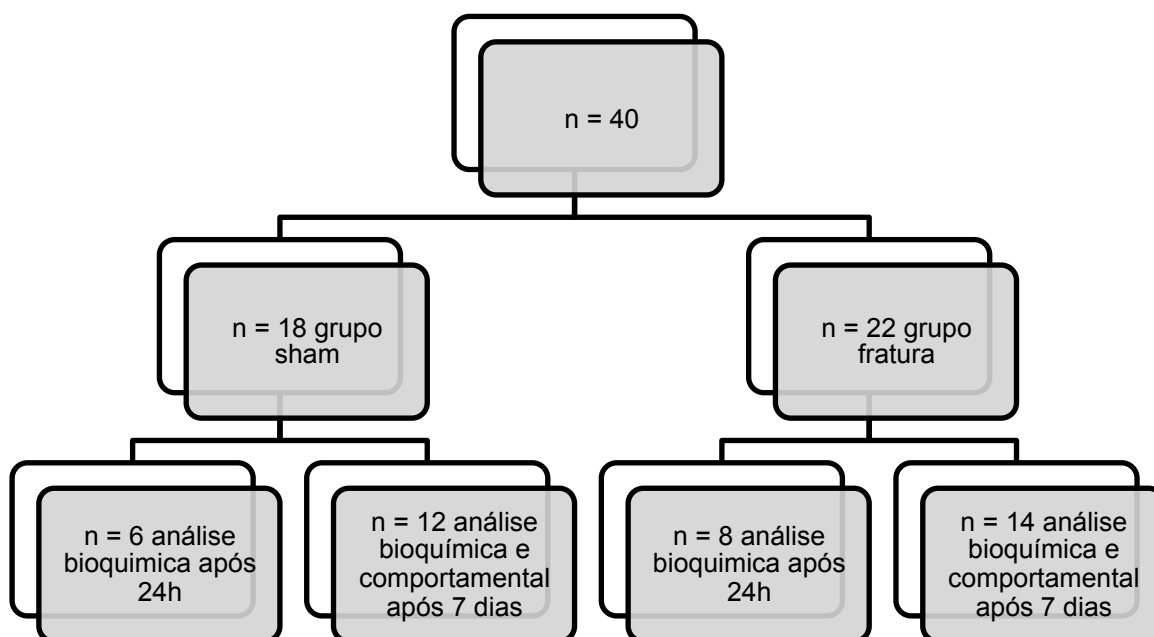


Figura 2 – Delineamento do estudo

3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

3.5.1 Modelo de fratura de tíbia

A fratura da tíbia foi realizada como descrito anteriormente por Harry et al¹³⁵. 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, 1 mg / 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 0,5 mm 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 1 mm 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 10 mm 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 (figura 3) e a reposição de fluido foi feita através da admi-

nistração de 0,5 ml de solução salina normal injetada subcutaneamente. O grupo controle (sham) foi realizado apenas a incisão na tibia sem a fratura da tibia. Os animais foram divididos em dois grupos sham e fratura de tibia (FT).

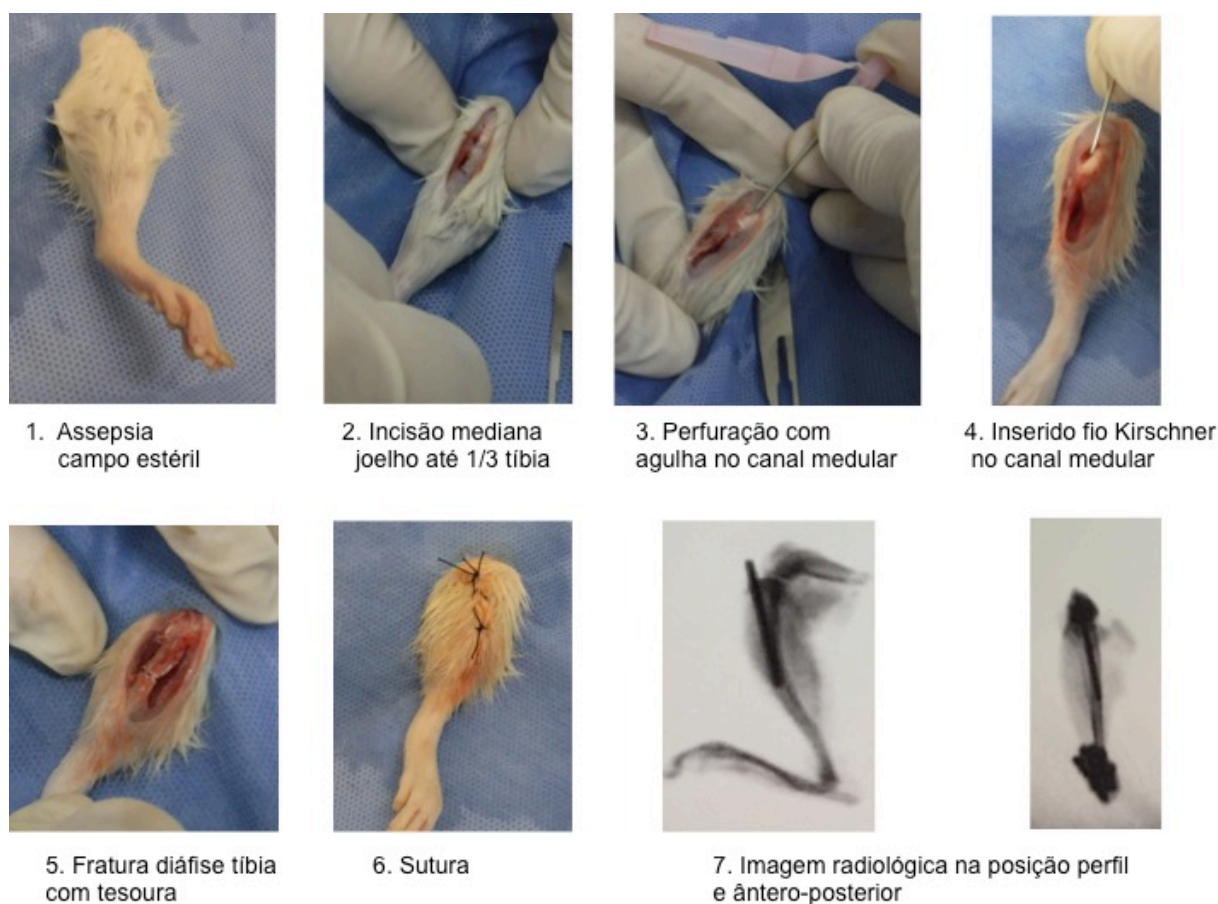


Figura 3. Etapas do modelo experimental de fratura na tibia.

3.5.2 Dano oxidativo em lipídios e proteínas

O dano em lipídios, foi avaliado pela técnica das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Brevemente as amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético a 10%, logo é adicionado ácido tiobarbitúrico a 0,67%. Leitura em absorbância de 535 nm usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos em equivalentes de malondialdeído (MDA) (nmol/mg de proteína)¹³⁶. O dano oxidativo em proteínas foi avaliado pela formação de grupamentos carbonilas. Inicialmente as proteínas são precipitadas com adição de ácido tricloroacético a 20%, sendo dissolvidas em dinitrofenilhidrazina. A absorbância é lida a 370 nanômetros, sendo os resultados expressos em nmol/mg de proteína^{137,138}.

3.5.3 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da SOD foi medida com base em sua capacidade de inibir espontaneamente a oxidação da adrenalina em adrenocromo. A SOD presente na amostra compete pelo radical O_2^- diminuindo a oxidação da adrenalina. Dessa forma a velocidade de formação do adrenocromo em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM em pH 10,2) e adrenalina (60 mM), indica a atividade da SOD, a variação de absorbância é medida em 480nm. Uma unidade de SOD produz aproximadamente 50% de auto-oxidação de adrenalina. Os resultados foram expressos como U/mg de proteína¹³⁹.

A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do H_2O_2 . A reação utiliza o método que emprega peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que deve ser convertido pela CAT em H_2O e O_2 . O tecido cerebral foi homogeneizado em tampão de fosfato 50 mmol/ L (pH 7,0), e a suspensão resultante foi centrifugada a 3000rpm durante 10 min. Uma alíquota de 100 μ l da amostra (20 μ l) foi adicionada a 1000 μ l da mistura de substrato. A mistura de substrato continha 0,3 ml de peróxido de hidrogênio em 50 ml de tampão ao fosfato 0,05 M (pH 7,0). Absorbâncias foram registradas em 240 nm nos tempos 0, 30 e 60 segundos após o início da reação. Uma curva padrão foi estabelecida utilizando catalase purificada (Sigma, MO) em condições idênticas. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína¹⁴⁰.

3.5.4 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método descrito por Lowry, Rosenbruogh e Randal (1951) baseado na reação de Folin- Ciocalteu, sendo usada para normalização dos resultados das dosagens bioquímicas¹⁴¹.

3.5.5 Testes comportamentais

Os testes comportamentais iniciaram 7 dias após a cirurgia, onde os animais foram testados de forma individual. Antes do início das sessões os animais foram ambientalizados a sala de testes por no mínimo 30 min. Todas as sessões foram registradas por câmera de vídeo com resolução 1280x720, sendo que os vídeos obtidos foram analisados posteriormente.

3.5.5.1 Avaliação da memória de habituação ao campo aberto

O teste de memória de habituação ao campo aberto ou *open field test*, tem por finalidade avaliar a memória do tipo não associativa durante a sessão teste. Para isso utiliza-se o aparato de Campo Aberto (Open-Field), de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo três de madeira e uma de vidro transparente. O piso do aparato de campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repete o mesmo procedimento. Os números de cruzamentos através das linhas pretas “crossings” e o número de “rearings” que é o ato de levantar-se nas patas traseiras, foram avaliados em ambas sessões¹⁴².

3.5.5.2 Avaliação da memória de reconhecimento de objetos

A avaliação da memória de reconhecimento de objetos de curta duração procedeu conforme a descrição de Vianna e colaboradores¹⁴³. No primeiro dia foi realizado o treino, onde o animal foi colocado cuidadosamente no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, o qual explorou o ambiente por 5 min sem presença de algum objeto. O primeiro dia é chamado de habituação do animal ao aparato. No segundo dia, 24h após, cada animal foi recolocado no aparelho, no qual estava dois objetos iguais, objeto A e objeto B (forma, tamanho e cor) que foram posicionados em dois cantos adjacentes a 10 cm da parede, foi contado então o tempo que o animal explorou cada objeto (A e B). No mesmo dia, 1h30min após, a memória de curta duração foi avaliada, quando o animal pode explorar novamente o ambiente na presença do primeiro objeto familiar (objeto A) e de um novo objeto (objeto C). Foi cronometrado novamente o tempo total que o animal gastou explorando cada objeto. No dia posterior, 24h após, um novo objeto (objeto D) foi colocado junto com objeto A, sendo então avaliada a memória de longa duração. Todos os objetos apresentaram textura lisa e pesos semelhantes (150-200g), apenas as formas geométricas foram diferentes. Neste teste comportamental foi utilizado o índice de reconhecimento para calcular o tempo gasto por cada animal para explorar os objetos, expressado-o como

uma razão $(TB/(TA+TB))$ onde TA foi o tempo gasto para explorar o objeto familiar; e TB o tempo gasto para explorar o novo objeto¹⁴³.

3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Para as análises bioquímicas os dados foram expressos em média e desvio padrão e as diferenças entre os grupos experimentais determinadas pelo teste t de Student para amostras independentes. Para a análise comportamental foram expressos como mediana e intervalo interquartil, as comparações entre os grupos foram realizadas usando teste Mann Whitney e as comparações individuais pelo teste Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos em todas as análises. As análises foram executadas utilizando o programa SPSS® versão 20.0. Os gráficos apresentados foram construídos no Graphpad Prism® versão 6.

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UNISUL sob registro: 16.013.5.05.IV conforme anexo A e 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-2013¹⁴⁴.

4. RESULTADOS

4.1 A FRATURA NA TÍBIA GEROU DANO OXIDATIVO CEREBRAL EM LIPÍDEOS E PROTEÍNAS

O gráfico 1 apresenta o dano oxidativo em lipídios, observou-se um aumento significativo dos equivalentes de MDA no grupo fratura de tíbia (FT) no hipocampo na análise após 7 dias. Na avaliação da carbonilação proteica (gráfico 2), constatou-se um aumento do dano oxidativo significativo no hipocampo no grupo FT tanto em 24h quanto em 7 dias, e um aumento significativo no córtex pré-frontal na análise de 24 horas.

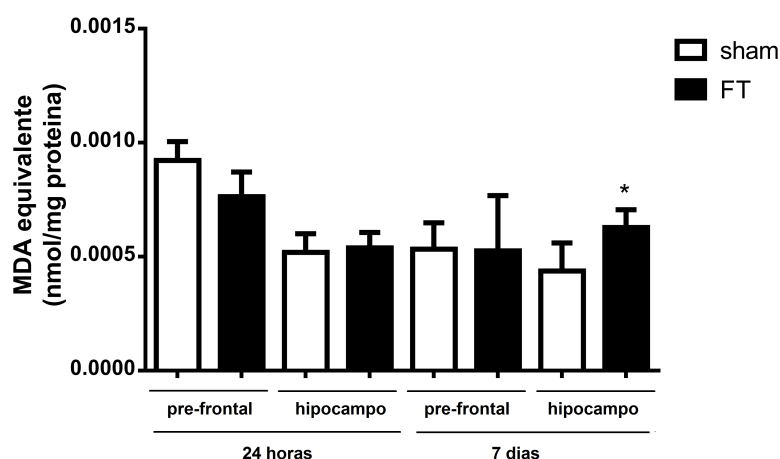


Gráfico 1. Equivalentes de malondialdeído (MDA) no córtex pré-frontal e no hipocampo em 24 horas e 7 dias após cirurgia no grupo sham e no grupo fratura da tíbia (FT). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham

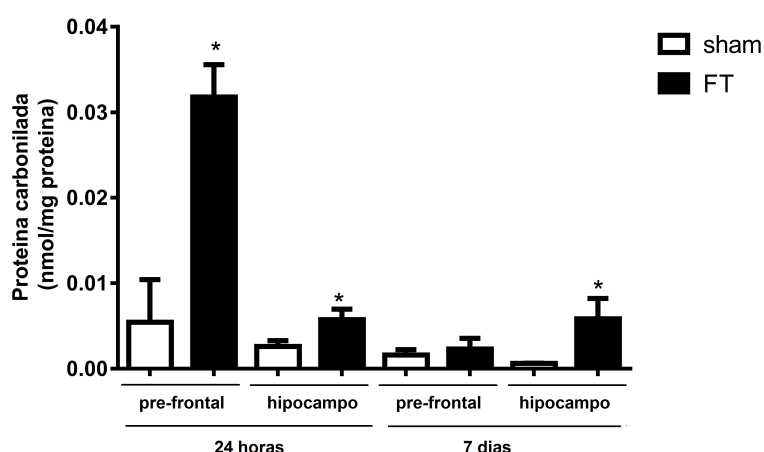


Gráfico 2. Proteína carbonilada no córtex pré-frontal e no hipocampo em 24 horas e 7 dias após cirurgia no grupo sham e no grupo fratura da tíbia (FT). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham

4.2 A FRATURA NA TÍBIA DIMINUIU A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES CEREBRAL

A SOD apresentou uma diminuição significativa da sua atividade, após 24h, no córtex pré-frontal e hipocampo. Entretanto após 7 dias, houve um aumento significativo em relação ao grupo sham no hipocampo. A CAT também apresentou diminuição significativa de sua atividade, 24h após o procedimento, tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo. Sua atividade manteve-se diminuída 7 dias após porém somente no hipocampo.

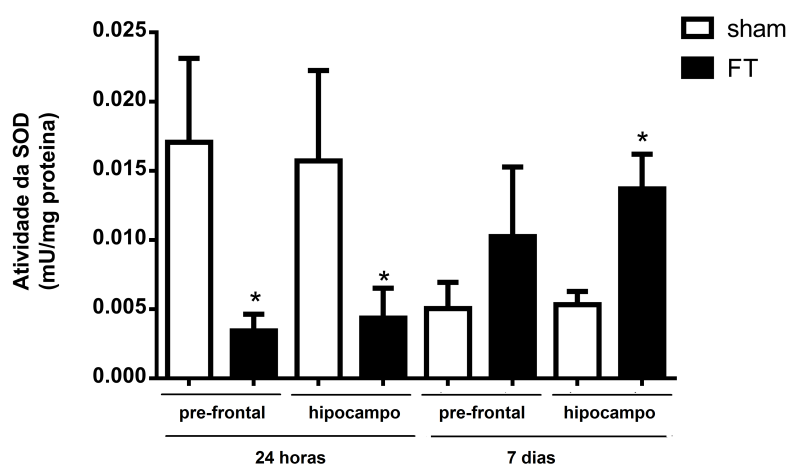


Gráfico 3. Atividade da superóxido dismutase (SOD) no córtex pré-frontal e no hipocampo em 24 horas e 7 dias após cirurgia no grupo sham e no grupo fratura da tíbia (FT). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham.

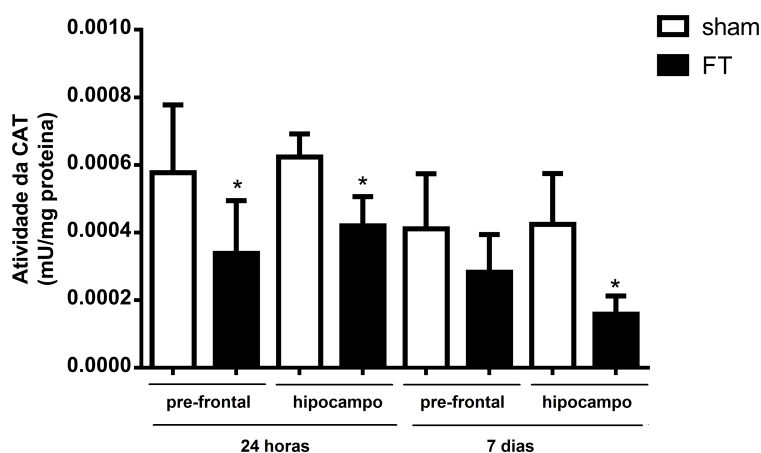


Gráfico 4. Atividade da catalase (CAT) no córtex pré-frontal e no hipocampo em 24 horas e 7 dias após cirurgia no grupo sham e no grupo fratura da tíbia (FT). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham.

4.3 A FRATURA NA TÍBIA GEROU UM PREJUÍZO NA MEMÓRIA DE HABITUAÇÃO E NA MEMÓRIA DE LONGO PRAZO

No teste de habituação em campo aberto foi observada a resposta exploratória do animal através do número de vezes que se levanta nas patas traseiras *rearing* e o número de cruzamentos *crossing* entre os quadrantes que o animal realizou, a partir do momento que é colocado no canto superior esquerdo do aparato. Observou-se uma diminuição do número de *crossings* (gráfico 5A) em ratos do grupo sham comparando-se a sessão treino e teste o que não ocorreu no grupo FT. Em relação ao número de *rearings* (gráfico 5B), o grupo sham não apresentou diferença, no entanto o grupo FT apresentou um indicativo de prejuízo de memória de habituação com o aumento da exploração comparando a sessão teste com treino.

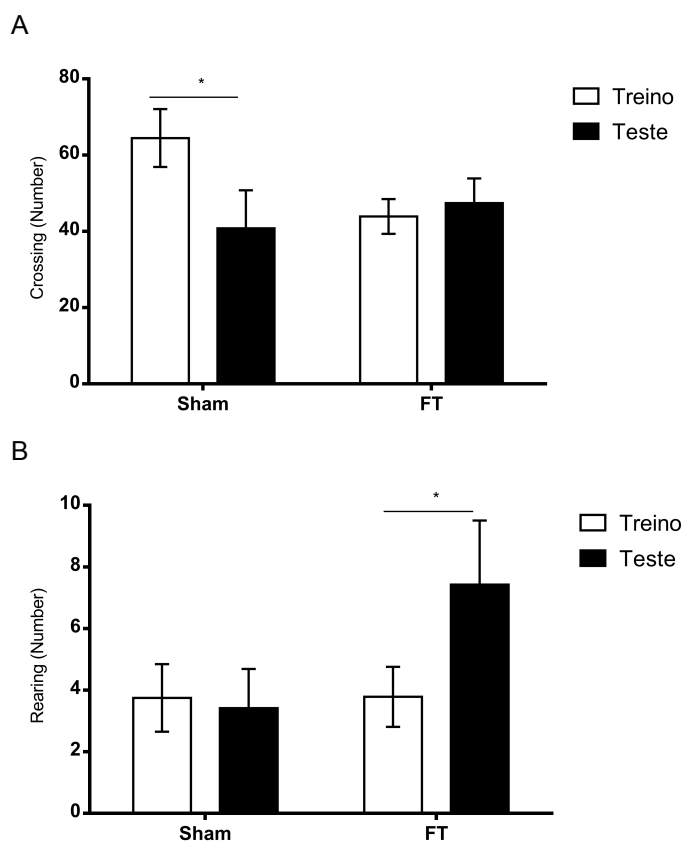
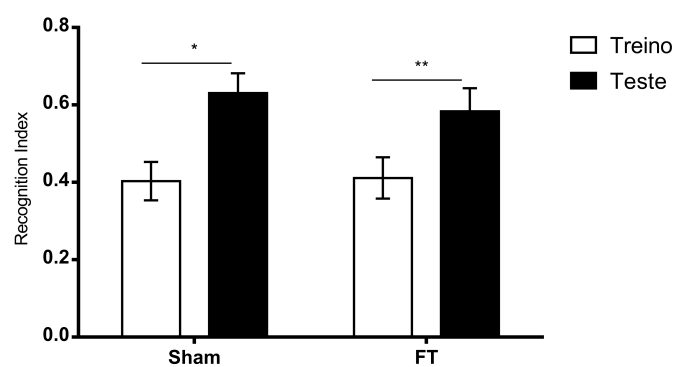


Gráfico 5. Número de *crossing*(A) e *rearings*(B) na avaliação da memória de habituação em campo aberto. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$ em relação ao grupo treino.

No teste de reconhecimento de objetos, na memória de curta duração (Gráfico 6A) o grupo sham apresentou uma melhora significativa, assim como o grupo FT não denotando um prejuízo na memória a curto prazo. No teste de reconhecimento de objetos, que avaliou a memória de longa duração (Gráfico 6B), foi possível verificar uma melhora significativa no grupo Sham, o que não aconteceu no grupo FT comparando treino e teste, denotando um prejuízo na memória a longo prazo.

A



B

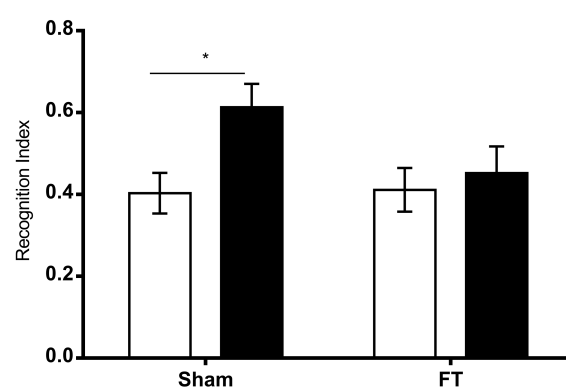


Gráfico 6. Índice de reconhecimento de objetos na memória a curto prazo(A) e longo prazo(B). Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5. DISCUSSÃO

A etiologia da DCPO ainda é desconhecida⁵. Utilizando diferentes modelos pré-clínicos de cirurgias periféricas tem-se visto que a neuroinflamação esta presente e tem sido repetidamente associada a déficits de memória^{34,112,113}. A supra-regulação das citocinas pró-inflamatórias sistêmicas, incluindo TNF- α , IL-1 β , a IL-6, os DAMPs como a HGMB1, ativam os macrófagos e contribuem para a patologia cerebral global após traumatismo periférico asséptico^{9,145–147}. Associado a isso, estudos têm demonstrado que os processos de isquemia-reperfusão que ocorrem após uma fratura estão associados ao desenvolvimento do estresse oxidativo^{148,149}.

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs; porém, a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta em alterações na sua estrutura e permeabilidade¹⁵⁰. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas; e formação de produtos citotóxicos, culminando na morte celular¹⁵¹.

Observou-se neste estudo um nível elevado dos equivalentes de MDA no hipocampo no sétimo dia pós-operatório. Wang e colaboradores¹⁵² em um modelo experimental de nefrectomia com injeção de lipopolisacarídeo observaram um aumento dos níveis de MDA no terceiro dia pós-operatório no hipocampo.

Em outro estudo experimental, em que se avaliou a concentração plasmática de MDA em ratos submetidos a fratura de fíbula, houve um pico plasmático mensurado no quinto dia após a fratura. Entretanto a concentração manteve-se alta até o trigésimo dia. O autor sugere que grandes quantidades de EROs são formadas no processo de cicatrização da fratura e que estes continuam ter efeito durante o primeiro mês após a fratura¹⁵³.

Gokturk e colaboradores¹⁵⁴ avaliaram o status oxidante durante a cicatrização óssea em ratos, utilizando os níveis de MDA em espécimes ósseos como indicador de estresse oxidativo. Aumentos estatisticamente significativos nos níveis de MDA foram observados pelos mesmos nos dias 7 e 14 após fratura da tíbia dos ratos. Eles concluíram que o estresse oxidativo pode ocorrer tardiamente após uma fratura.

Neste estudo a oxidação proteica foi mensurada pela proteína carbolinada. Esta teve um aumento em ambas estruturas cerebrais, e após 24 horas e 7 dias, só não

sendo significativa no cortex pré-frontal após 7 dias da cirurgia. Tomak e colaboradores¹⁵⁵ em um estudo experimental avaliando a cicatrização óssea, observaram níveis elevados de equivalentes de MDA e de proteína carbonilada em ratos com fratura de femur. Dkhar e Sharma¹⁵⁶ mostraram que os níveis de proteína carbonilada estão elevados no tecido cerebral com o envelhecimento e este aumento depende da produção e acúmulo de EROs.

De fato, o envelhecimento está associado com níveis aumentados de radicais livres e danos associados com o estresse oxidativo no cérebro de mamíferos, incluindo a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e ácidos nucleicos¹⁵⁷⁻¹⁶². A razão para este aumento relacionado com a idade no estresse oxidativo nos cérebros de mamíferos idosos ainda não é clara, embora as preparações de mitocôndrias dos cérebros de roedores idosos exibam um aumento significativo dependente da idade na produção de superóxido e peróxido de hidrogênio^{162,163}. Vários estudos relataram diminuições associadas à idade na atividade de superóxido dismutase e atividade de catalase em cérebro de ratos^{160,164}.

Na avaliação do sistema antioxidante, encontrou-se uma significativa redução da atividade da SOD e da CAT, 24 horas após o procedimento. A CAT persistiu o decaimento no sétimo dia, já a atividade da SOD foi restabelecida com valores superiores ao grupo controle.

An e colaboradores¹⁶⁵ dosaram a atividade da SOD no hipocampo em um modelo experimental de esplenectomia. A atividade foi diminuída de forma significativa no primeiro e terceiro dia. No sétimo dia teve um aumento entretando em níveis menores ainda que o controle. Eles administraram em um grupo o acetaminofeno e constataram que o mesmo preveniu a diminuição da atividade da SOD bem como atenuou a elevação de MDA.

Karlidag e colaboradores¹¹⁵ avaliaram, em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca, marcadores do estresse oxidativo na presença ou não do delírio pós-operatório. Concluíram que pacientes com níveis baixos de CAT no pré-operatório pareciam ser mais suscetíveis ao delírio do que pacientes com maiores níveis de CAT.

Le e colaboradores¹⁶⁶ realizaram hepatectomia parcial em ratos adultos jovens e ratos idosos para avaliar se o DCPO em animais envolve outras áreas do cérebro além do hipocampo e como a idade influencia a DCPO de animais jovens adultos e idosos. Concluíram que DCPO induzida pela hepatectomia parcial envolve principal-

mente comprometimento do hipocampo. Ademais a perda diferencial das espinhas dendríticas neuronais e neuroinflamação no hipocampo são os mais prováveis mecanismo para a formação de DCPO em ratos idosos.

Adicionalmente, Berr e colaboradores¹⁶⁷ em um estudo de coorte determinaram se o estresse oxidativo está associado ao declínio cognitivo. Os indivíduos com os níveis mais altos de TBARS mostram um risco aumentado de declínio cognitivo odds ratio ajustado 2,25. Sugeriram que níveis aumentados de estresse oxidativo e ou deficiências de antioxidantes podem constituir fatores de risco para o declínio cognitivo.

Em relação aos testes comportamentais, observou-se que no teste do campo aberto os ratos do grupo sham tiveram redução significativa do número de *crossings* denotando um reconhecimento pelo local, o que não ocorreu no grupo fratura. Já no número de *rearings* percebeu-se um aumento significativo no grupo fratura denotando um aumento da atividade exploratória na sessão teste.

No teste de reconhecimento de objetos observou-se um prejuízo na memória de longa duração nos ratos submetidos a fratura. Para o teste de reconhecimento de objetos algumas áreas cerebrais como hipocampo, córtex temporal, córtex pré-frontal, estão envolvidas no processamento de memórias de curta e longa duração, declarativa e não-associativa. Acredita-se que a formação de memórias e o aprendizado envolvam alterações na atividade neural, através de eventos plásticos que modificam a comunicação entre os neurônios. Estes eventos plásticos podem incluir alterações na estrutura, na distribuição no número de sinapses e também resultar em alterações morfológicas^{168,169}.

Bi e colaboradores¹⁷⁰ encontraram que a memória e a aprendizagem diminuíram por um curto período em ratos após a esplenectomia. A cognição foi comprometida no 1º, 3º e 5º dias após a esplenectomia, e a recuperação foi observada até o 7º dia. Estes resultados sugerem que a cognição foi reduzida transitoriamente após a esplenectomia.

Revisões de DCPO após cirurgia não cardíaca revelam que os dois domínios cognitivos mais comumente avaliados foram aprendizagem e memória; atenção e concentração. Nos pacientes submetidos a cirurgia não cardíaca 70% dos estudos incluíram um teste de memória e aprendizagem. Do mesmo modo 57% dos estudos, incluindo pacientes submetidos a cirurgia não cardíaca, incluíram um teste de atenção e concentração. Cerca de um terço dos estudos incluiu testes de habilidades verbais e linguísticas e testes de habilidades visuais e espaciais. Poucos estudos incluíram

testes de raciocínio numérico (6% para ambos os tipos de indivíduos) ou função executiva (6% para cirurgias não cardíacas)¹⁷¹.

Embora uma variedade de métodos de pontuação para a detecção de DCPO tenham sido utilizados, os investigadores geralmente concordam que os métodos de pontuação devem considerar o desempenho basal, os efeitos na prática e a mudança em mais de um teste neuropsicológico. As avaliações da linha de base permitem determinar se uma mudança real no funcionamento cognitivo ocorreu após o evento cirúrgico¹⁷²⁻¹⁷⁵.

Ramlawi e colaboradores¹⁷⁶ avaliaram o estresse oxidativo quantificando os níveis de peróxido plasmático em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca. Os pacientes foram submetidos em testes neurocognitivos antes e após os procedimentos. Os pacientes com declínio cognitivo apresentaram níveis mais elevados de peróxido no quarto dia pós-operatório comparado com os pacientes sem declínio cognitivo. Entretanto 6 horas após o procedimento não teve diferenças significativas entre os grupos.

Forster e colaboradores¹⁷⁷ também sugeriram de que o prejuízo associado à idade das funções cognitiva e motora é devida a danos moleculares oxidativos e testaram em ratos. Constataram que o declínio nos ratos idosos na aprendizagem e memória exibidos quando testados com o teste de labirinto espacial de natação tem sido correlacionado com um aumento no teor de carbonilação proteica no córtex cerebral.

Dados de estudos experimentais em animais mostraram fatores envolvidos no declínio cognitivo. São eles: um aumento persistente no estresse oxidativo; uma redução acentuada na produção de neurônios recém-formados no hipocampo, devido à proliferação reduzida de células progenitoras; alterações na arborização e densidade dendrítica em neurônios recém-formado e existentes no hipocampo; redução das funções dependentes do hipocampo de aprendizagem e memória em camundongos idosos, camundongos deficientes em SOD e camundongos expostos a radiação de baixa dose¹⁷⁸⁻¹⁸⁴.

Diante deste estudo encontramos que o estresse oxidativo está envolvido no declínio cognitivo de ratos submetido a um modelo experimental de fratura. Podendo, assim, ser uma provável via paralela a cascata inflamatória no surgimento da DCPO. Estudos futuros poderão melhor determinar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao estresse oxidativo na gênese da disfunção cognitiva.

6. CONCLUSÃO

Concluiu-se que em ratos idosos submetidos em modelo experimental de fratura na tíbia ocorreu:

- a peroxidação lipídica e oxidação proteica através da elevação MDA e proteínas carboniladas no córtex pré-frontal e hipocampo;
- uma diminuição da atividade antioxidante da SOD e CAT no córtex pré-frontal e hipocampo;
- prejuízo na memória de habituação e reconhecimento de objetos .

REFERÊNCIAS

1. Berger M, Nadler JW, Browndyke J, Terrando N, Ponnusamy V, Cohen HJ, et al. Postoperative Cognitive Dysfunction. Minding the Gaps in Our Knowledge of a Common Postoperative Complication in the Elderly. *Anesthesiol Clin*. Elsevier Inc; 2015;33(3):517–50.
2. Hartholt KA. Postoperative cognitive dysfunction in geriatric patients. *Z Gerontol Geriatr*. 2012;45(5):411–6.
3. Tomaszewski D. Biomarkers of Brain Damage and Postoperative Cognitive Disorders in Orthopedic Patients: An Update. *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015:402959.
4. Steinmetz J, Christensen KB, Lund T, Lohse N, Rasmussen LS, Group I. Long-term consequences of postoperative cognitive dysfunction. *Anesthesiology*. 2009;110(3):548–55.
5. Rasmussen LS, O'Brien JT, Silverstein JH, Johnson TW, Siersma VD, Canet J, et al. Is peri-operative cortisol secretion related to post-operative cognitive dysfunction? *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005;49(9):1225–31.
6. Berger M, Burke J, Eckenhoff R, Mathew J. Alzheimer's disease, anesthesia, and surgery: A clinically focused review. Vol. 28, *J Cardiothorac and Vasc Anesth*. 2014. p. 1609–23.
7. Terrando N, Monaco C, Ma D, Foxwell BMJ, Feldmann M, Maze M. Tumor necrosis factor- triggers a cytokine cascade yielding postoperative cognitive decline. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(47):20518–22.
8. Terrando N, Eriksson LI, Kyu Ryu J, Yang T, Monaco C, Feldmann M, et al. Resolving postoperative neuroinflammation and cognitive decline. *Ann Neurol*. 2011;70(6):986–95.
9. Su X, Feng X, Terrando N, Yan Y, Chawla A, Koch LG, et al. Dysfunction of inflammation-resolving pathways is associated with exaggerated postoperative cognitive decline in a rat model of the metabolic syndrome. *Mol Med*. 2012;18:1481–90.
10. Bartels K, Ma Q, Venkatraman TN, Campos CR, Smith L, Cannon RE, et al. Effects of deep hypothermic circulatory arrest on the blood brain barrier in a cardiopulmonary bypass model - a pilot study. *Heart Lung Circ*. 2014;23(10):981–4.
11. Hu N, Guo D, Wang H, Xie K, Wang C, Li Y, et al. Involvement of the blood-brain barrier opening in cognitive decline in aged rats following orthopedic surgery and high concentration of sevoflurane inhalation. *Brain Res*. Elsevier; 2014;1551:13–24.
12. He HJ, Wang Y, Le Y, Duan KM, Yan X Bin, Liao Q, et al. Surgery Upregulates High Mobility Group Box-1 and Disrupts the Blood-Brain Barrier causing Cognitive Dysfunction in Aged Rats. *CNS Neurosci Ther*. 2012;18(12):994–1002.
13. Reynolds A, Laurie C, Lee Mosley R, Gendelman HE. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders. Vol. 82, *International Review of Neurobiology*. 2007. p. 297–325.
14. Monk TG, Weldon BC, Garvan CW, Dede DE, van der Aa MT, Heilman KM, et al. Predictors of cognitive dysfunction after major noncardiac surgery. *Anesthesiology*. 2008;108(1):18–30.

15. Ansaloni L, Catena F, Chattat R, Fortuna D, Franceschi C, Mascitti P, et al. Risk factors and incidence of postoperative delirium in elderly patients after elective and emergency surgery. *Br J Surg*. 2010;97(2):273–80.
16. Björkelund KB, Hommel A, Thorngren K-G, Gustafson L, Larsson S, Lundberg D. Reducing delirium in elderly patients with hip fracture: a multi-factorial intervention study. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2010 Mar 15;54(6):678–88.
17. Demeure MJ, Fain MJ. The Elderly Surgical Patient and Postoperative Delirium. *J Am Coll Surg*. 2006;203(5):752–7.
18. Inouye SK, Van Dyck CH, Alessi CA, Balkin S, Siegel AP, Horwitz RI. Clarifying confusion: The confusion assessment method: A new method for detection of delirium. *Ann Intern Med*. 1990;113(12):941–8.
19. Monk TG, Price CC. Postoperative cognitive disorders. *Curr Opin Crit Care*. 2011;17(4):376–81.
20. Bryson GL, Wyand A. Evidence-based clinical update: general anesthesia and the risk of delirium and postoperative cognitive dysfunction. *Can J Anaesth*. 2006;53(7):669–77.
21. Rasmussen LS. Postoperative cognitive dysfunction: Incidence and prevention. Vol. 20, *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*. 2006. p. 315–30.
22. Dijkstra JB, Houx PJ, Jolles J. Cognition After Major Surgery in the Elderly: Test Performance and Complaints. *Surv Anesthesiol*. 2000;44(2):79.
23. Krenk L, Rasmussen LS, Kehlet H. New insights into the pathophysiology of postoperative cognitive dysfunction. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2010;54:951–6.
24. Fischer P, Jungwirth S, Zehetmayer S, Weissgram S, Hoenigschnabl S, Gelpi E, et al. Conversion from subtypes of mild cognitive impairment to Alzheimer dementia. 2007;
25. Krenk L, Rasmussen LS. Postoperative delirium and postoperative cognitive dysfunction in the elderly – what are the differences ? *Minerva Anesthesiol*. 2011;77(7):742–9.
26. Moller JT, Cluitmans P, Rasmussen LS, Houx P, Rasmussen H, Canet J, et al. Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly: ISPOCD1 study. *Lancet*. 1998;351(9106):857–61.
27. Ballard C, Jones E, Gauge N, Aarsland D, Nilsen OB, Saxby BK, et al. Optimised anaesthesia to reduce post operative cognitive decline (POCD) in older patients undergoing elective surgery, a randomised controlled trial. *PLoS One*. 2012;7(6).
28. Scott JE, Mathias JL, Kneebone AC. Postoperative cognitive dysfunction after total joint arthroplasty in the elderly: a meta-analysis. *J Arthroplasty*. 2014;29(2):261–7.e1.
29. Deiner S, Silverstein JH. Postoperative delirium and cognitive dysfunction. *Br J Anaesth*. 2009;103 Suppl:i41–46.
30. Newman MF, Kirchner JL, Phillips-Bute B, Gaver V, Grocott H, Jones RH, et al. Longitudinal assessment of neurocognitive function after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med*. 2001;344(6):395–402.
31. Chan MTV, Cheng BCP, Lee TMC, Gin T. BIS-guided Anesthesia Decreases Postoperative Delirium and Cognitive Decline. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2012;25(1):1.
32. Silbert BS, Evered LA, Scott DA. Incidence of postoperative cognitive dysfunction after general or spinal anaesthesia for extracorporeal shock wave lithotripsy. *Br J Anaesth*. 2014;113(5):784–91.
33. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating

- mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010;464(7285):104–7.
34. Rosczyk HA, Sparkman NL, Johnson RW. Neuroinflammation and cognitive function in aged mice following minor surgery. *Exp Gerontol*. 2008;43(9):840–6.
 35. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, et al. Alarmins: Awaiting a clinical response. Vol. 122, *Journal of Clinical Investigation*. 2012. p. 2711–9.
 36. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* (80-). 2002;296:301–5.
 37. Bianchi ME, Manfredi AA. Immunology: Dangers In and Out. *Science* (80-). 2009;323(5922):1683–4.
 38. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: Chemotactic activators of immune responses. Vol. 17, *Current Opinion in Immunology*. 2005. p. 359–65.
 39. Levy RM, Mollen KP, Prince JM, Kaczorowski DJ, Vallabhaneni R, Liu S, et al. Systemic inflammation and remote organ injury following trauma require HMGB1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(4):R1538–44.
 40. Vacas S, Degos V, Feng X, Maze M. The neuroinflammatory response of postoperative cognitive decline. *Br Med Bull*. 2013;106(1):161–78.
 41. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(July):428–35.
 42. Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol*. 2009;86(3):557–66.
 43. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen M a D, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med*. 2007;13(9):1042–9.
 44. Cho T-J, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2002;17(3):513–20.
 45. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*. 2003;88(5):873–84.
 46. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2001;16(6):1004–14.
 47. Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, Kohler T, M??ller R, Wu AC, et al. Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J Bone Miner Res*. 2011;26(7):1517–32.
 48. Raggatt LJ, Wullschleger ME, Alexander KA, Wu ACK, Millard SM, Kaur S, et al. Fracture healing via periosteal callus formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification. *Am J Pathol*. 2014;184(12):3192–204.
 49. Pettit AR, Chang MK, Hume DA, Raggatt LJ. Osteal macrophages: A new twist on coupling during bone dynamics. Vol. 43, *Bone*. 2008. p. 976–82.
 50. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. Vol. 42, *Injury*. 2011. p. 551–5.
 51. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(3):133–43.
 52. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during

- fracture repair: The cellular picture. Vol. 19, Seminars in Cell and Developmental Biology. 2008. p. 459–66.
53. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1191–7.
 54. O’Keefe RJ, Mao J. Bone Tissue Engineering and Regeneration: From Discovery to the Clinic—An Overview. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011;17(6):389–92.
 55. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14(2):179–86.
 56. Waters R V, Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Avnur Z, Hill E, et al. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Acta Orthop Scand*. 2000;71(3):316–21.
 57. Butcher SK, Lord JM. Stress responses and innate immunity: Aging as a contributory factor. Vol. 3, *Aging Cell*. 2004. p. 151–60.
 58. Tang D, Kang R, Ili HJZ, Lotze MT. High-Mobility Group Box 1, Oxidative Stress, and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(7):1315–35.
 59. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol*. 1990;186(1981):1–85.
 60. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992;59:1609–23.
 61. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. Elsevier Ltd; 2015;97:55–74.
 62. Rosenfeldt F, Wilson M, Lee G, Kure C, Ou R, Braun L, et al. Oxidative stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology and therapy. *Exp Gerontol*. 2013;48(1):45–54.
 63. Ikeda Y, Anderson JH, Long DM. Oxygen free radicals in the genesis of traumatic and peritumoral brain edema. *Neurosurgery*. 1989;24(5):679–85.
 64. Oda T, Nakai I, Mituo M, Yamagishi H, Oka T, Yoshikawa T. Role of oxygen radicals and synergistic effect of superoxide dismutase and catalase on ischemia-reperfusion injury of the rat pancreas. *Transpl Proc*. 1992;24(3):797–8.
 65. Rangan U, Bulkley G. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull*. 1993;49(3):700–18.
 66. Cohen M V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: Is this the time for clinical trials? Vol. 111, *Annals of Internal Medicine*. 1989. p. 918–31.
 67. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*. 1986;246(2):501–14.
 68. Gutteridge JMC. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*. 1994;91(2–3):133–40.
 69. Hou YC, Janczuk A, Wang PG. Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr Pharm Des*. 1999;5(6):417–41.
 70. Stryer L. *Biochemistry*. 4th ed. Freeman and Company, editor. New York; 1995. 732 p.
 71. Green SJ, Mellouk S, Hoffman SL, Meltzer MS, Nacy CA. Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: Cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunol Lett*. 1990;25(1–3):15–9.
 72. Shami NJIE, Moreira EAM. Lycopene as an antioxidant agent. *Rev Nutr*. 2004;17(2):227–36.

73. Tahara EB, Navarete FDT, Kowaltowski AJ. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(9):1283–97.
74. Méndez Filho J, Rodríguez H. Sobre los beneficios de los radicales libres. *Rev Med IMSS*. 1997;35(4):309–13.
75. Godic A, Poljsak B, Adamic M, Dahmane R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014.
76. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Vol. 10, *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. 449–450 p.
77. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. Vol. 111, *Chemical Reviews*. 2011. p. 5944–72.
78. Ghezzi P, Bonetto V, Fratelli M. Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(7–8):964–72.
79. Sung C-C, Hsu Y-C, Chen C-C, Lin Y-F, Wu C-C. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:301982.
80. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47–95.
81. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Vol. 10, *Free Radical Biology and Medicine*. 2007. 449–450 p.
82. Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez A. Oxidative stress in alzheimer's disease: Why did antioxidant therapy fail? Vol. 2014, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014.
83. Prakash R, Singapalli T, Gokulnath. Review of oxidative stress in relevance to uremia. *Clin Queries Nephrol*. 2012;1(3):215–21.
84. Small DM, Coombes JS, Bennett N, Johnson DW, Gobe GC. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2012;17(4):311–21.
85. Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Today's oxidative stress markers. *Med Pr*. 2015;66(3):393–405.
86. Pfeifer R, Darwiche S, Kohut L, Billiar TR, Pape HC. Cumulative effects of bone and soft tissue injury on systemic inflammation: A pilot study. *Clin Orthop Relat Res*. 2013;471(9):2815–21.
87. Menzel CL, Pfeifer R, Darwiche SS, Kobbe P, Gill R, Shapiro RA, et al. Models of lower extremity damage in mice: Time course of organ damage and immune response. *J Surg Res*. 2011;166(2).
88. Zhang C, Yang J, Jennings LK. Leukocyte-derived myeloperoxidase amplifies high-glucose-induced endothelial dysfunction through interaction with high-glucose-stimulated, vascular non-leukocyte-derived reactive oxygen species. *Diabetes*. 2004;53(11):2950–9.
89. Wang Z, Ehnert S, Ihle C, Schyschka L, Pscherer S, Nussler NC, et al. Increased oxidative stress response in granulocytes from older patients with a hip fracture may account for slow regeneration. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:1–9.
90. Banks WA. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol*. 2009;9 Suppl 1(Suppl 1):S3.
91. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*. 2005;57(2):173–85.
92. Chan-Ling T, Hughes S, Baxter L, Rosinova E, McGregor I, Morcos Y, et al.

- Inflammation and breakdown of the blood-retinal barrier during “physiological aging” in the rat retina: a model for CNS aging. *Microcirculation*. 2007;14(1):63–76.
93. Banks W a, Erickson M a. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis*. 2010;37(1):26–32.
 94. Zhang H, Adwanikar H, Werb Z, Noble-Haeusslein LJ. Matrix metalloproteinases and neurotrauma: evolving roles in injury and reparative processes. *Neuroscientist*. 2010;16(2):156–70.
 95. Abdullah Z, Bayraktutan U. NADPH oxidase mediates TNF-??-evoked in vitro brain barrier dysfunction: Roles of apoptosis and time. *Mol Cell Neurosci*. 2014;61:72–84.
 96. Abdul-Muneer PM, Chandra N, Haorah J. Interactions of Oxidative Stress and Neurovascular Inflammation in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. *Molecular Neurobiology*. 2014;
 97. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. Vol. 64, *Brain Research Reviews*. 2010. p. 328–63.
 98. Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. Vol. 158, *Neuroscience*. 2009. p. 983–94.
 99. Terrando N, Yang T, Ryu JK, Newton PT, Monaco C, Feldmann M, et al. Stimulation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor protects against neuroinflammation after tibia fracture and endotoxemia in mice. *Mol Med*. 2015;20(5):667–75.
 100. Beckman J, Crow J. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans*. 1993;21(2):330–4.
 101. Beckman J, Koppenol W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271(73):C1424–37.
 102. Mollace V, Nistico G. Release of nitric oxide from astroglial cells: A key mechanism in neuroimmune disorders. *Adv Neuroimmunol*. 1995;5(4):421–30.
 103. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol*. 1996;9(5):836–44.
 104. Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia. Vol. 158, *Neuroscience*. 2009. p. 1021–9.
 105. Ben-Hur T, Ben-Menachem O, Furer V, Einstein O, Mizrahi-Kol R, Grigoriadis N. Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2003;24(3):623–31.
 106. Cacci E, Claassen JH, Kokaia Z. Microglia-derived tumor necrosis factor-?? exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J Neurosci Res*. 2005;80(6):789–97.
 107. Cacci E, Ajmone-Cat MA, Anelli T, Biagioni S, Minghetti L. In vitro neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia. *Glia*. 2008;56(4):412–25.
 108. Ming G, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2005;28:223–50.
 109. Rachal Pugh C, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW. The immune system and memory consolidation: A role for the cytokine IL-1?? Vol. 25, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2001. p. 29–41.
 110. Chen J, Buchanan JB, Sparkman NL, Godbout JP, Freund GG, Johnson RW.

- Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *Brain Behav Immun*. 2008;22(3):301–11.
111. Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. Vol. 18, *Trends in Neurosciences*. 1995. p. 130–6.
 112. Wan Y, Xu J, Ma D, Zeng Y, Cibelli M, Maze M. Postoperative impairment of cognitive function in rats: a possible role for cytokine-mediated inflammation in the hippocampus. *Anesthesiology*. 2007;106(3):436–43.
 113. Wuri G, Wang D-X, Zhou Y, Zhu S-N. Effects of surgical stress on long-term memory function in mice of different ages. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2011;55(4):474–85.
 114. Buvanendran A, Kroin JS, Berger R a, Hallab NJ, Saha C, Negrescu C, et al. Upregulation of prostaglandin E2 and interleukins in the central nervous system and peripheral tissue during and after surgery in humans. *Anesthesiology*. 2006;104(3):403–10.
 115. Karlidag R, Unal S, Sezer OH, Bay Karabulut A, Battaloglu B, But A, et al. The role of oxidative stress in postoperative delirium. *Gen Hosp Psychiatry*. 2006;28(5):418–23.
 116. Huang TT, Leu D, Zou Y. Oxidative stress and redox regulation on hippocampal-dependent cognitive functions. *Arch Biochem Biophys*. Elsevier Inc.; 2014;
 117. Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(5):339–50.
 118. Leuner B, Gould E. Structural plasticity and hippocampal function. *Annu Rev Psychol*. 2010;61:111–40, C1-3.
 119. Izquierdo I. *Memória*. Porto Alegre: ArtMed; 2002.
 120. Eric Kandel. In search of memory The emergence of a new science of mind. Vol. 116, *Journal of Clinical Investigation*. 2006. 1131 p.
 121. Squire, LR, & Kandel E. *Memória: Da mente às moléculas*. 2003;Porto Aleg.
 122. Purves, D, Augustine, GJ, Fitzpatrick, D, Hall, W C, La- Mantia, A-S, McNamara, J O, & White LE. *Neurociências*. 4th ed. Porto Alegre; 2010.
 123. Mourão Júnior CA, Faria NC. *Memória*. *Psicol Reflexão e Crítica*. 2015;28(4):780–8.
 124. Lent R. *Cem bilhões de neurônios?: Conceitos fundamentais de neurociência*. 2nd ed. Sao Paulo, SP: Atheneu; 2010.
 125. Izquierdo I. *A arte de esquecer: cérebro e memória*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Vieira & Lent; 2010.
 126. Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo L a, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 1998;393(6686):635–6.
 127. Burwell D. The Parahippocampal Region: Corticocortical Connectivity. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;911(1):25–42.
 128. van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(4):272–82.
 129. Kolb B, Muhammad A. Harnessing the power of neuroplasticity for intervention. *Front Hum Neurosci*. 2014;8(JUNE):377.
 130. Burke SN, Barnes CA. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(1):30–40.
 131. Trompet S, De Craen AJM, Slagboom P, Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, et al. Genetic variation in the interleukin-1 β -converting enzyme associates with

- cognitive function. The PROSPER study. *Brain*. 2008;131(4):1069–77.
132. Andersen SL. Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev*. 2003;27(1–2):3–18.
 133. Lu SM, Yu CJ, Liu YH, Dong HQ, Zhang X, Zhang SS, et al. S100A8 contributes to postoperative cognitive dysfunction in mice undergoing tibial fracture surgery by activating the TLR4/MyD88 pathway. *Brain Behav Immun*. Elsevier Inc.; 2015;44:221–34.
 134. Quillfeldt JA. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. *Most*. 2006;41.
 135. Harry LE, Sandison A, Paleolog EM, Hansen U, Pearse MF, Nanchahal J. Comparison of the healing of open tibial fractures covered with either muscle or fasciocutaneous tissue in a murine model. *J Orthop Res*. 2008;26(9):1238–44.
 136. De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*. 1989;26(3–4):335–41.
 137. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464–78.
 138. Draper HH, Hadley M. Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants. Vol. 186, *Methods in Enzymology*. 1990. 421–431 p.
 139. Bannister J V, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987;32:279–312.
 140. Aebi H. [13] Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105(C):121–6.
 141. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–75.
 142. de Lima MNM, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schröder N. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp Gerontol*. 2005 Jun;40(6):506–11.
 143. Vianna MR, Izquierdo L a, Barros DM, Walz R, Medina JH, Izquierdo I. Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *An Acad Bras Cienc*. 2000;72:353–64.
 144. (Concea) CNDCEA/ MDCTEI. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. *Vasa*. 2013;1–50.
 145. Vacas S, Degos V, Tracey KJ, Maze M. High-mobility group box 1 protein initiates postoperative cognitive decline by engaging bone marrow-derived macrophages. *Anesthesiology*. 2014;120(5):1160–7.
 146. Terrando N, Brzezinski M, Degos V, Eriksson LI, Kramer JH, Leung JM, et al. Perioperative cognitive decline in the aging population. *Mayo Clin Proc*. 2011;86(9):885–93.
 147. Degos V, Vacas S, Han Z, van Rooijen N, Gressens P, Su H, et al. Depletion of bone marrow-derived macrophages perturbs the innate immune response to surgery and reduces postoperative memory dysfunction. *Anesthesiology*. 2013;118(3):527–36.
 148. Shewetta S a, Khoshhal KI. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Curr Drug Metab*. 2007;8:519–25.
 149. Cetinus E, Kiliç M, Uzel M, Inanç F, Kurutaş EB, Bilgic E, et al. Does long-term ischemia affect the oxidant status during fracture healing? *Arch Orthop Trauma Surg*. 2005;125(6):376–80.
 150. Mello Filho AC, Hoffmann ME, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by

- hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J.* 1984;218(1):273–5.
151. C H. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol.* 1989;26(4):277–85.
 152. Wang P, Cao J, Liu N, Li M, Zhou X, Zhang H, et al. Protective effects of edaravone in adult rats with surgery and lipopolysaccharide administration-induced cognitive function impairment. *PLoS One.* 2016;11(4).
 153. Yeler H, Tahtabas F, Candan F. Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. *Cell Biochem Funct.* 2005;23(2):137–9.
 154. Göktürk E, Turgut a, Bayçu C, Günal I, Seber S, Gülbaz Z. Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.* 1995;66(5):473–5.
 155. Amanvermez R, Gunay M, Piskin A, Keles G, Tomak L. TNF- α , IL-1 β , and oxidative stress during fracture healing with or without ankaferd. *Bratisl Lek Listy.* 2013;114(11):621–4.
 156. Dkhar P, Sharma R. Effect of dimethylsulphoxide and curcumin on protein carbonyls and reactive oxygen species of cerebral hemispheres of mice as a function of age. *Int J Dev Neurosci. International Society for Developmental Neuroscience;* 2010;28(5):351–7.
 157. Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Colombrita C, Spadaro F, Butterfield DA, et al. Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging: Relationship with mitochondrial function and glutathione redox state. In: *Mechanisms of Ageing and Development.* 2004. p. 325–35.
 158. Cini M, Moretti A. Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol Aging.* 1995;16(1):53–7.
 159. Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, et al. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(18):10469–74.
 160. O'Donnell E, Lynch MA. Dietary antioxidant supplementation reverses age-related neuronal changes. *Neurobiol Aging.* 1998;19(5):461–7.
 161. Rodrigues Siqueira I, Fochesatto C, Da Silva Torres IL, Dalmaz C, Netto CA. Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. *Life Sci.* 2005;78(3):271–8.
 162. Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev.* 1994;74(1–2):121–33.
 163. Sawada M, Carlson JC. Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat. *Mech Ageing Dev.* 1987;41(1–2):125–37.
 164. Rao G, Xia E, Richardson A. Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fischer F344 rats. *Mech Ageing Dev.* 1990;53(1):49–60.
 165. An L-N, Yue Y, Guo W-Z, Miao Y-L, Mi W-D, Zhang H, et al. Surgical Trauma Induces Iron Accumulation and Oxidative Stress in a Rodent Model of Postoperative Cognitive Dysfunction. *Biol Trace Elem Res.* 2013;151(2):277–83.
 166. Le Y, Liu S, Peng M, Tan C, Liao Q, Duan K, et al. Aging differentially affects the loss of neuronal dendritic spine, neuroinflammation and memory impairment at rats after surgery. *PLoS One.* 2014;9(9).
 167. Berr C, Balansard B, Arnaud J, Roussel AM AA. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. *Etude du Vieillissement Artériel. J Am Geriatr Soc.* 2000;48(10):1285–91.

168. Rusakov DA, Davies HA, Harrison E, Diana G, Richter-Levin G, Bliss TVP, et al. Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience*. 1997;80(1):69–77.
169. Geinisman Y. Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning. *Cereb Cortex*. 2000;10(10):952–62.
170. Bi Y, Liu S, Yu X, Wu M, Wang M, Wang Y. Adaptive and regulatory mechanisms in aged rats with postoperative cognitive dysfunction. *Neural Regen Res*. 2014;9(5):534–9.
171. Newman S, Stygall J, Hirani S, Shaefi S, Maze M. Postoperative cognitive dysfunction after noncardiac surgery: a systematic review. *Anesthesiology*. 2007;106(3):572–90.
172. Murkin JM, Newman SP, Stump DA, Blumenthal JA. Statement of consensus on assessment of neurobehavioral outcomes after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*. 1995;59(5):1289–95.
173. Lewis M, Maruff P, Silbert B. Statistical and conceptual issues in defining post-operative cognitive dysfunction. Vol. 28, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2004. p. 433–40.
174. Funder KS, Steinmetz J, Rasmussen LS. Methodological issues of postoperative cognitive dysfunction research. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2010;14(2):119–22.
175. Sauër A-M, Kalkman C, van Dijk D. Postoperative cognitive decline. *J Anesth*. 2009;23(2):256–9.
176. Ramlawi B, Rudolph JL, Mieno S, Khabbaz K, Sodha NR, Boodhwani M, et al. Serologic markers of brain injury and cognitive function after cardiopulmonary bypass. *Ann Surg*. 2006;244(4):593–601.
177. Forster MJ, Dubey A, Dawson KM, Stutts WA, Lal H, Sohal RS. Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(10):4765–9.
178. Hu D, Serrano F, Oury TD, Klann E. Aging-dependent alterations in synaptic plasticity and memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *J Neurosci*. 2006;26(15):3933–41.
179. Bizon JL, Gallagher M. Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur J Neurosci*. 2003;18(1):215–9.
180. Meyer RC, Spangler EL, Kametani H, Ingram DK. Age-associated memory impairment. Assessing the role of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;854:307–17.
181. Jinno S. Decline in adult neurogenesis during aging follows a topographic pattern in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol*. 2011;519(3):451–66.
182. Martinez-Canabal A, Akers KG, Josselyn SA, Frankland PW. Age-dependent effects of hippocampal neurogenesis suppression on spatial learning. *Hippocampus*. 2013;23(1):66–74.
183. Kamsler A, Avital A, Greenberger V, Segal M. Aged SOD overexpressing mice exhibit enhanced spatial memory while lacking hippocampal neurogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(2):181–9.
184. Petralia RS, Mattson MP, Yao PJ. Communication breakdown: The impact of ageing on synapse structure. Vol. 14, *Ageing Research Reviews*. 2014. p. 31–42.

ANEXO A – Parecer Aprovação Comitê de Ética



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

Palhoça, 14 de julho de 2016
Registro na CEUA (código): 16.013.5.05.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Fabricia Cardoso Petronilho.

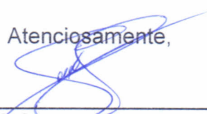
Prezado(a),

Viemos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Avaliação de parâmetros neuroinflamatórios, neuroquímicos e comportamentais em ratos submetidos à cirurgia de fratura de tíbia”, registrada com o nº 16.013.5.05.IV, sob a responsabilidade de Fabricia 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 14/07/2016.

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

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,



Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão



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

Palhoça, 14 de julho de 2016

CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação de parâmetros neuroinflamatórios, neuroquímicos e comportamentais em ratos submetidos à cirurgia de fratura de tíbia", registrada com o nº 16.013.5.05.IV, sob a responsabilidade de Fabricia 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, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 14/07/2016.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De 01/08/2016 até 31/05/2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> , ratos Wistar.
No de animais	40
Peso/Idade	450g a 600g/ 18 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade do Vale do Itajaí


Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão

Campus Florianópolis - Unidade Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - CEP 88137-270 - Palhoça - SC - Fone 55-48-3279-1036 - ceua@unisul.br