

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RODRIGO VIANA

**INVESTIGAÇÃO EXPERIMENTAL DA RELAÇÃO ENTRE A SEPSE
PÓS-ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO E O
ESTRESSE OXIDATIVO PERIFÉRICO: UM PANORAMA ENTRE
MACHOS E FÊMEAS**

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2023

RODRIGO VIANA

**INVESTIGAÇÃO EXPERIMENTAL DA RELAÇÃO ENTRE A SEPSE
PÓS-ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO E O
ESTRESSE OXIDATIVO PERIFÉRICO: UM PANORAMA ENTRE
MACHOS E FÊMEAS**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabricia Cardoso Petronilho.

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

V614iViana, Rodrigo.

Investigação experimental da relação entre a sepse pós-acidente vascular cerebral isquêmico e o estresse oxidativo periférico: um panorama entre machos e fêmeas/ Rodrigo Viana. - 2023.

57p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2023.

Orientação: Fabricia Cardoso Petronilho.

1. Sepse. 2. Estresse oxidativo. 3. Acidente vascular cerebral isquêmico. 4. Nervos periféricos.
I. Título.

CDD 23. ed. 616.944

Bibliotecária Eliziane de LuccaAlosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 426

Com início às 13 (treze) horas e 30 (trinta) minutos do dia 19 (dezenove) de dezembro de 2023 (dois mil e vinte e três), realizou-se, na Sala 227/Bloco S, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **RODRIGO VIANA**, sob a orientação da **Profa. Dra. Fabricia Cardoso Petronilho**, intitulada “**INVESTIGAÇÃO EXPERIMENTAL DA RELAÇÃO ENTRE A SEPSE PÓS-ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO E O ESTRESSE OXIDATIVO PERIFÉRICO: UM PANORAMA ENTRE MACHOS E FÊMEAS**”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Jaqueline da Silva Generoso (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, e Prof. Dr. Rafael Mariano de Bitencourt (Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: APROVADO, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 15h (quinze) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 19 (dezenove) de dezembro de 2023 (dois mil e vinte e três).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Samiris Albano Pereira
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

Esta dissertação foi elaborada seguindo a resolução n. 07/2015 do Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Doenças Cerebrovasculares do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma doença que apresenta altas taxas de incidência, mortalidade e incapacidade, e a gravidade da doença pode ser afetada por vários fatores de risco e comorbidades. Pode ser classificado em AVC isquêmico (AVCi) e AVC hemorrágico (AVCh), sendo o AVCi mais prevalente. Mesmo com alta mortalidade, globalmente, mais de 80 milhões de pessoas sobreviveram a um AVC. Assim, das morbidades decorrentes do AVC, a infecção pós-AVC é comumente exibida podendo piorar o desfecho da doença e aumentando o risco de desenvolvimento de sepse. Nesse contexto, é sabido que o estresse oxidativo causa comprometimento funcional de órgãos periféricos na sepse. Diante disso, este estudo teve por objetivo estudar o desenvolvimento do estresse oxidativo, decorrente de sepse pós-AVCi em órgãos periféricos. Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas de 60 dias de idade. Os grupos experimentais foram aleatoriamente divididos em sham+sham machos, sham+sham fêmeas, MCAO+sham machos, MCAO+sham fêmeas, sham+CLP machos, sham+CLP fêmeas, MCAO+CLP machos, MCAO+CLP fêmeas. Os animais foram submetidos ao AVCi pelo modelo experimental de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) por 60 minutos ou sham. Após 7 dias de reperfusão foram submetidos à sepse pelo modelo experimental de ligação e perfuração cecal (CLP) ou sham e em 24h após realizada a punção cardíaca para retirada do soro seguido da retirada do cérebro total, amostras de pulmão, fígado, coração e baço. Foram avaliados edema cerebral, atividade de mieloperoxidase (MPO), concentração de nitrito/nitrato, dano oxidativo em lipídios e proteínas e a atividade da enzima catalase (CAT). Os dados foram avaliados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* Tukey e considerados significantes para $p < 0,05$. Foi verificada uma potencialização do aumento de edema cerebral em ratos machos quando induzidos a sepse pós-AVCi sobre animais submetidos somente ao AVCi. No efeito da sepse pós-AVCi em órgãos periféricos e soro, foi encontrado somente em machos um aumento da atividade da MPO como indicativo de infiltrado de neutrófilos em diferentes órgãos e soro em animais submetidos a sepse pós-AVCi. Nos níveis de nitrito/nitrato a potencialização de sepse pós-AVCi foi mais evidente em fêmeas. Em relação ao estresse oxidativo, houve uma variabilidade no que se refere ao sexo. De maneira geral percebeu-se um aumento de parâmetros de estresse oxidativo somente em animais submetidos a sepse pós-AVCi ou com aumento potencializado nesse grupo em relação aos demais. Os animais submetidos ao modelo de AVCi tornam-se de fato mais vulneráveis aos efeitos deletérios da sepse no que refere-se ao edema cerebral e ao estresse oxidativo sistêmico e em órgãos periféricos. Além disso, ocorre uma variabilidade de acordo com o parâmetro avaliado em relação a diferença de sexo. Tal resultado remete a possibilidade de futuras investigações mais direcionadas para o envolvimento das diferenças de gêneros aplicadas aos parâmetros aqui avaliados.

Palavras-chave: acidente vascular cerebral isquêmico; sepse; estresse oxidativo; órgãos periféricos.

ABSTRACT

The stroke is a disease that has high rates of incidence, mortality and disability, and the severity of the disease can be affected by several risk factors and comorbidities. It can be classified into ischemic stroke and hemorrhagic stroke, with ischemic stroke being the most prevalent. Even with high mortality, globally, more than 80 million people have survived a stroke. Thus, of the morbidities resulting from stroke, post-stroke infection is commonly exhibited, which can worsen the outcome of the disease, such as the development of sepsis. In this context, it is known that oxidative stress causes functional impairment of peripheral organs in sepsis. Therefore, we aimed to study the development of oxidative stress, resulting from post-stroke sepsis in peripheral organs. Male and female Wistar rats aged 60 days were used. The experimental groups were randomly divided into sham+sham males, sham+sham females, MCAO+sham males, MCAO+sham females, sham+CLP males, sham+CLP females, MCAO+CLP males, MCAO+CLP females. The animals were subjected to ischemic stroke using the experimental model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 60 minutes or sham. After 7 days of reperfusion, they were subjected to sepsis using the cecal ligation and perforation (CLP) or sham experimental model and 24 hours later, cardiac puncture was performed to remove serum, followed by removal of the total brain, lung, liver, heart and spleen samples. Cerebral edema, myeloperoxidase activity (MPO), nitrite/nitrate concentration, oxidative damage to lipids and proteins and the activity of the catalase enzyme (CAT) were evaluated. Data were evaluated by ANOVA followed by the Tukey post hoc test and considered significant at $p < 0,05$. An increase in cerebral edema was observed in male rats when post-stroke sepsis was induced over animals subjected only to ischemic stroke. Regarding the effect of post-stroke sepsis on peripheral organs and serum, an increase in MPO activity was found only in males as an indication of neutrophil infiltration in different organs and serum in animals subjected to post-stroke sepsis. In nitrite/nitrate levels, the increase in post-stroke sepsis was more evident in females. In relation to oxidative stress, there was variability regarding sex, in general, an increase in oxidative stress parameters was observed only in animals subjected to post-stroke sepsis or with a greater increase in this group in relation to the others. Animals subjected to the ischemic stroke model actually become more vulnerable to the deleterious effects of sepsis in terms of cerebral edema and systemic oxidative stress and in peripheral organs. Furthermore, there is variability according to the parameter evaluated in relation to gender differences. This result raises the possibility of future investigations more focused on the involvement of gender differences applied to the parameters evaluated here.

Key-words: ischemic stroke; sepsis; oxidative stress; peripheral organs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Fluxograma representando as respostas celulares e moleculares no AVCi.
Fonte: Adaptado de Campbell et al., 2019.13
- Figura 2:** Gráfico com os resultados de edema cerebral, sham+sham machos (n=6), sham+sham fêmeas (n=6), MCAO+sham machos (n=10), MCAO+sham fêmeas (n=10), sham+CLP machos (n=12), sham+CLP fêmeas (n=12), MCAO+CLP machos (n=14), MCAO+CLP fêmeas (n=14).29
- Figura 3:** Gráfico com os resultados de atividade da mieloperoxidase no soro, pulmão, coração, fígado e baço, sham+sham machos (n=6), sham+sham fêmeas (n=6), MCAO+sham machos (n=10), MCAO+sham fêmeas (n=10), sham+CLP machos (n=12), sham+CLP fêmeas (n=12), MCAO+CLP machos (n=14), MCAO+CLP fêmeas (n=14).30
- Figura 4:** Gráfico com os resultados de concentração de nitrito/nitrado no soro, pulmão, coração, fígado e baço, sham+sham machos (n=6), sham+sham fêmeas (n=6), MCAO+sham machos (n=10), MCAO+sham fêmeas (n=10), sham+CLP machos (n=12), sham+CLP fêmeas (n=12), MCAO+CLP machos (n=14), MCAO+CLP fêmeas (n=14).32
- Figura 5:** Gráfico com os resultados de equivalente de MDA no soro, pulmão, coração, fígado e baço, sham+sham machos (n=6), sham+sham fêmeas (n=6), MCAO+sham machos (n=10), MCAO+sham fêmeas (n=10), sham+CLP machos (n=12), sham+CLP fêmeas (n=12), MCAO+CLP machos (n=14), MCAO+CLP fêmeas (n=14).34
- Figura 6:** Gráfico com os resultados de proteína carbonilada no soro, pulmão, coração, fígado e baço, sham+sham machos (n=6), sham+sham fêmeas (n=6), MCAO+sham machos (n=10), MCAO+sham fêmeas (n=10), sham+CLP machos (n=12), sham+CLP fêmeas (n=12), MCAO+CLP machos (n=14), MCAO+CLP fêmeas (n=14).35

Figura 7: Gráfico com os resultados de atividade da CAT no soro, pulmão, coração, fígado e baço, sham+sham machos (n=6), sham+sham fêmeas (n=6), MCAO+sham machos (n=10), MCAO+sham fêmeas (n=10), sham+CLP machos (n=12), sham+CLP fêmeas (n=12), MCAO+CLP machos (n=14), MCAO+CLP fêmeas (n=14).37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIT – Ataque isquêmico transitório

ANOVA – Análise de variância

AVC – Acidente vascular cerebral

AVCh – Acidente vascular cerebral hemorrágico

AVCi – Acidente vascular cerebral isquêmico

CAT – Catalase

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CLP – Ligação e perfuração cecal (*Cecal ligation and puncture*)

DAMPs – Padrões moleculares associados a danos (*Damage-associated molecular Pattern*)

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GPx – Glutaciona peroxidase

HPA – Hipotálamo hipófise adrenal

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

MCAO – Oclusão da artéria cerebral média (*Middle Cerebral Artery Occlusion*)

MPO – Mieloperoxidase

mPTP – Poro de transição de permeabilidade mitocondrial

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear kappa B (*Nuclear factor kappa B*)

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NMDA – N-Metil-D-aspartato

nNOS – Oxido nítrico sintase neuronal (*Neuronal nitric oxide synthase*)

PAM – Pressão arterial média

PRR – Receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern recognition receptors*)

SNS – Sistema nervoso simpático

SOD – Superóxido dismutase

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TLR – Receptores do tipo *Toll-Like* (*Toll-like receptors*)

TNF- α – Fator de necrose tumoral alpha (*Tumor necrosis factor α*)

UTI – Unidade de terapia intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DO AVC	10
1.2 FISIOPATOLOGIA DO AVCi.....	12
1.3 IMUNOSSUPRESSÃO PÓS-AVCi.....	14
1.4 COMPROMETIMENTO DE ÓRGÃOS PERIFÉRICOS PÓS-AVCi E SEPSE .	16
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO EM ÓRGÃOS PERIFÉRICOS NA SEPSE.....	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 ANIMAIS	24
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	24
3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE AVCi.....	25
3.4 MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE	25
3.5 EDEMA CEREBRAL.....	26
3.6 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	26
3.6.1 Atividade da mieloperoxidase	27
3.6.2. Determinação de nitrito/nitrato	27
3.6.3. Avaliação de dano oxidativo aos lipídios e proteínas	27
3.6.4. Enzimas antioxidantes	28
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4 RESULTADOS	29
4.1 EDEMA CEREBRAL.....	29
4.2 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE.....	29
4.3 DETERMINAÇÃO DE NITRITO/NITRATO	31
4.4 AVALIAÇÃO DE DANO OXIDATIVO AOS LIPÍDIOS E PROTEÍNAS	33
4.5 ATIVIDADE DA CATALASE	36
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DO AVC

A definição “tradicional” do AVC é clínica e baseada no início súbito de perda da função neurológica focal ou global, devido infarto com persistência por mais de 24 horas ou morte precoce, enquanto o episódio transitório de disfunção neurológica sem a presença de infarto, é determinado como ataque isquêmico transitório (Easton et al., 2009; Bray et al., 2019). O AVC é uma das principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo e pode ser classificado em AVCi e AVCh (Henriksson et.al., 2012; Sacco et al., 2013).

O AVCi, é definido pela perda súbita de fluxo sanguíneo para uma área do cérebro com a consequente perda da função neurológica. Durante a oclusão de um vaso, há uma área central (núcleo isquêmico) onde os danos ao cérebro são irreversíveis e uma área de penumbra onde o cérebro perde a função devido a diminuição do fluxo sanguíneo, mas não é irreversivelmente lesada (Hacke et al., 2008; Albers et al., 2018; Nogueira et al., 2018). As causas etiológicas do AVCi incluem: aterosclerose de grandes artérias, embolia cardíaca, oclusão de pequenas artérias, causas incomuns e causas indeterminadas (Arsava et al., 2017).

O AVCh é ocasionado devido ao extravasamento sanguíneo e inclui a hemorragia intracerebral e hemorragia subaracnóide (Xiao et al., 2017). Um AVCh ocorre quando um vaso sanguíneo cerebral se rompe, extravasando sangue nos tecidos circundantes. Dessa forma, existem três principais causas de AVCh: o primeiro é por um aneurisma, que faz com que uma parte do vaso sanguíneo enfraquecido se expanda e às vezes se rompa. A outra é por uma malformação arteriovenosa, que envolve vasos sanguíneos anormalmente formados, se esse vaso sanguíneo se romper pode causar um AVCh. Por fim, a pressão arterial muito alta pode causar o enfraquecimento dos pequenos vasos sanguíneos no cérebro e resultar em AVCh (Yu et al., 2019; Tsao et al., 2022).

O AVC (incluindo AVCi e AVCh) afeta 13,7 milhões de pessoas em todo o mundo por ano e é a segunda principal causa de morte, com 5,5 milhões de mortes por ano (Global Burden of Disease Stroke Collaborators, 2019; World Stroke Organization, 2019). Estima-se que 1 em cada 4 adultos sofrerá um AVC ao longo da vida e há mais de 80 milhões de sobreviventes de AVC em todo o mundo (Feigin

et al., 2018). Embora a taxa de mortalidade por AVC tenha diminuído significativamente em vários países devido ao desenvolvimento contínuo da medicina, a sua incidência está aumentando (Feigin et al., 2014). De 2006 a 2016, a prevalência de AVCi aumentou em 2,7%, enquanto a prevalência de AVCh diminuiu em 1,7% (Benjamin et al., 2019). Ademais, o número de AVC está previsto para mais do que o dobro entre os anos de 2010 a 2050 (Ouriques Martins et al., 2019). Quando incluído todos os tipos de AVC, 87% são isquêmicos, 10% são hemorragia intracranial e 3% são hemorragia subaracnoide (Virani et al., 2022).

Os fatores de risco para o AVCi são classificados em modificáveis e não modificáveis (Roger et al., 2012). Os modificáveis incluem hipertensão, fibrilação atrial, diabetes mellitus, tabagismo e dislipidemias. Já os principais fatores não modificáveis são o sexo, idade, hereditariedade e localização geográfica (Adams et al., 2008). Se tratando do sexo biológico, as mulheres enfrentam um desfecho desproporcional de mortalidade e incapacidade por AVCi. Além disso, existem diferenças na apresentação, na resposta ao tratamento e nos resultados do AVCi (Rexrode et al., 2022).

Nos Estados Unidos, em 2019, o AVCi foi a terceira principal causa de morte em mulheres, em comparação com o quinto lugar entre os homens. As mulheres foram acometidas em 57,1% das mortes por AVCi em 2019, sendo que o AVCi foi responsável por 6,2% de todas as mortes femininas, enquanto compreende 4,4% de todas as mortes masculinas (Heron., 2021). No *Greater Cincinnati Northern Kentucky Stroke Study* (GCNKSS) de 2015, a letalidade de casos de AVCi em mulheres excedeu a dos homens pela primeira vez, mesmo após ajuste para a idade (Rehman et al., 2019; Madsen et al., 2020).

Globalmente, o risco de AVCi ao longo da vida (a partir dos 25 anos) é de 25,1% nas mulheres e 24,7% nos homens, mas existe uma variação regional substancial (Feigin et al., 2018). Dados recentes do Canadá mostram que o risco de AVCi e ataque isquêmico transitório (AIT) é mais elevado nas mulheres do que nos homens com menos de 30 anos de idade, mais elevado nos homens na meia-idade e igual acima dos 80 anos de idade (Vyas et al., 2021). Na categoria mais idosa (>85 anos), há alguma sugestão de que as mulheres têm maior incidência de AVCi do que os homens (Petrea et al., 2009; Vyas et al., 2021).

Estudos mostraram que as mulheres têm maior probabilidade do que os homens de relatar sintomas neurológicos não focais. No entanto, a diferença

absoluta nos sintomas por sexo foi pequena, e estes estudos concentraram-se em sintomas individuais (Lisabeth et al., 2009; Stuart-Shor et al., 2009).

Os estudos geralmente relataram pior recuperação funcional e menor qualidade de vida após AVCi para mulheres em comparação com homens (Reeves et al., 2008). Além disso, as mulheres tiveram pior desempenho nas dimensões medidas de dor/desconforto, ansiedade/depressão, fadiga e mobilidade do que os homens (Gall et al., 2018; Katzan et al., 2018).

De modo geral, as mulheres apresentam resultados piores após o AVCi do que os homens no que diz respeito à mortalidade, qualidade de vida, depressão pós-AVC e limitações de atividade. As diferenças são parcialmente explicadas pela pior saúde das mulheres no momento que são acometidas pelo AVCi, idade avançada e maior gravidade do AVC (Boden-Albala et al., 2005; Gall et al., 2018).

1.2 FISIOPATOLOGIA DO AVCi

O evento inicial do AVCi é a oclusão de uma artéria cerebral levando a isquemia focal e desenvolvimento de infarto. Grande parte da fisiopatologia é resultante da lesão neuronal, morte celular necrótica e processos inflamatórios secundários. Mecanismos celulares específicos de lesão cerebral que foram identificados no AVCi incluem a excitotoxicidade, falha de energia, despolarização peri-infarto, estresse oxidativo e inflamação, que contribuem para a extensão e gravidade da perda tecidual (Iadecola et al., 2020). A região potencialmente recuperável do cérebro ao redor do núcleo do infarto, conhecida como penumbra, continua a receber suprimento sanguíneo suficiente para permanecer metabolicamente ativa, mas é funcionalmente silenciosa por um período de tempo (Woodruff et al., 2011). Vias alternativas de fluxo sanguíneo (chamadas colaterais) podem sustentar a viabilidade no cérebro em regiões de penumbra por um período de tempo. A extensão do fluxo colateral varia substancialmente entre os indivíduos e provavelmente tem determinantes genéticos e ambientais (Zhang et al., 2010).

Especificamente, a depleção de oxigênio e nutrientes no cérebro no AVCi, tem várias consequências celulares e moleculares que afetam a função neuronal e glial, além de causar alterações vasculares e neuroinflamação conforme demonstrado na figura 1. Inicialmente, quando o suprimento de oxigênio e nutrientes é interrompido, os neurônios não conseguem mais manter seu gradiente

transmembrana, levando ao comprometimento da sinalização neuronal (Patel et al., 2017). A despolarização anóxica nos terminais pré-sinápticos resulta na liberação de neurotransmissores excitatórios, onde a sua retirada da fenda é um processo dependente de energia; assim, as concentrações de neurotransmissores (incluindo glutamato) aumentam (Smith et al., 2015).

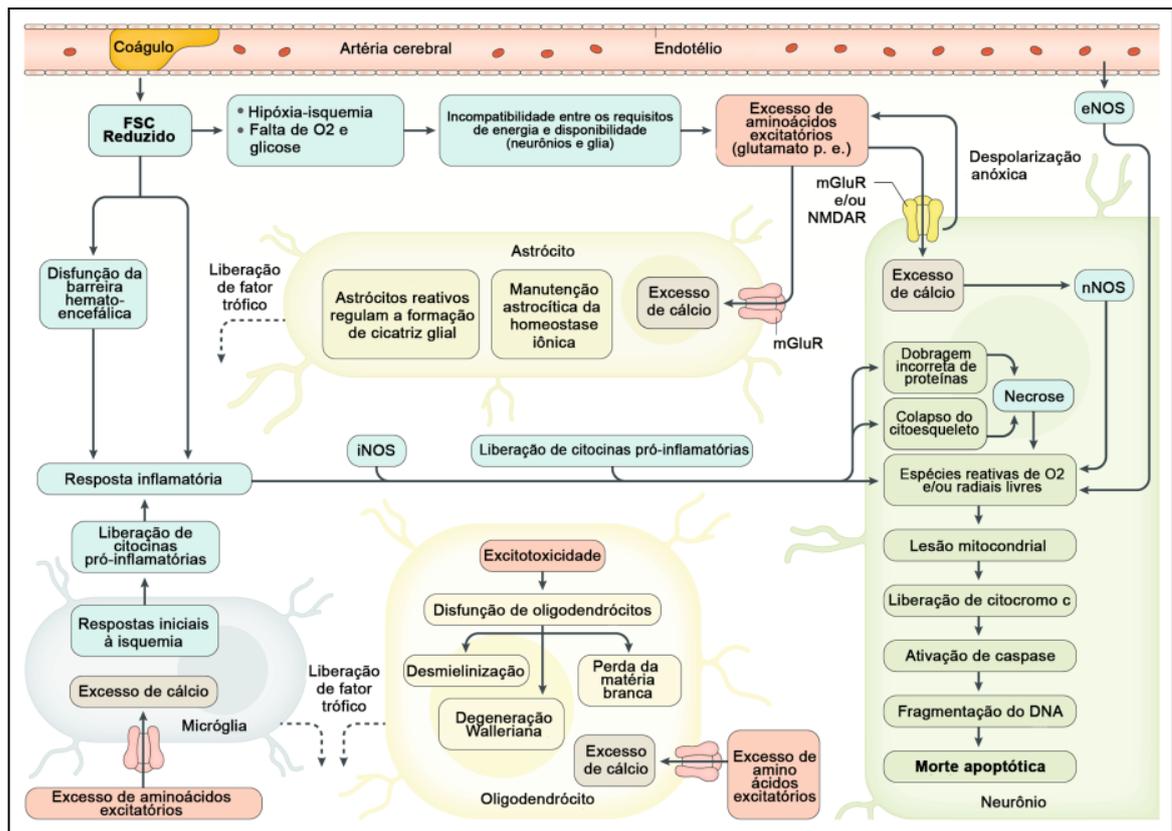


Figura 1: Fluxograma representando as respostas celulares e moleculares no AVCi. Fonte: Adaptado de Campbell et al., 2019.

Com potencial de membrana em repouso, a condutância através do receptor N-Metil-D-aspartato (NMDA) aberto é limitada, pois o canal é bloqueado pelo magnésio extracelular. Após a despolarização, o magnésio é removido e a condução é substancialmente maior levando ao aumento de influxo de cálcio (Ca^{2+}) e ativação de oxido nítrico sintase neuronal (nNOS), com consequente produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e início de processos de morte celular (Flippo et al., 2018). No que se refere a função mitocondrial, a atividade da cadeia respiratória é altamente reduzida, o dano mitocondrial se acumula e as defesas antioxidantes endógenas são esgotadas acarretando dano oxidativo aos complexos enzimáticos. Por fim, o aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular após isquemia inicia a

formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) que resulta na ativação da cascata de apoptose (Lo et al., 2003; Lakhan et al., 2009).

A apoptose pode proporcionar a liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que estimulam os receptores de reconhecimento de padrões (PRR), como os receptores do tipo *Toll-Like* (TLR Receptors), ativando o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (Chen et al., 2019). Conseqüentemente, ocorre a produção de mediadores pró-inflamatórios como interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) e quimiocinas (Yilmaz et al., 2010).

A morte de pericitos também ocorre, e a quebra da barreira hematoencefálica associada ao perfil pró-inflamatório estabelecido pode contribuir para a entrada de células inflamatórias periféricas no parênquima cerebral e aumento do risco de hemorragia. Tem sido sugerido o acúmulo de neutrófilos no núcleo isquêmico, com ativação e proliferação da microglia na área de penumbra já durante os estágios iniciais do AVCi (nos primeiros 3 dias) (Jurcau e Ardelean, 2022).

1.3 IMUNOSSUPRESSÃO PÓS-AVCi

Com o forte perfil pró-inflamatório estabelecido após o AVCi no cérebro, ocorre a descompensação do sistema imunológico periférico. Esse fenômeno resulta em imunossupressão (Faura et al., 2021). No entanto, existem outros argumentos para suportar a hipótese de que AVCi pode interferir na comunicação que envolve cérebro e sistema imune. Além do estabelecimento da neuroinflamação, o evento isquêmico pode danificar circuitos cerebrais envolvidos entre o cérebro e o sistema imune, com conseqüências a longo prazo (Prass et al., 2006; Whiteley et al., 2009).

Foi demonstrado experimentalmente que as células imunes do baço são encontradas no cérebro 24 a 96h após o AVCi (Seifert et al., 2012). A principal conseqüência dessa resposta inflamatória sistêmica é o infiltrado celular no parênquima cerebral como células inatas ativadas (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e *natural killer*) e adaptativas (células T), facilitado pelo aumento da expressão de moléculas de adesão (Beuker et al., 2021). Nas primeiras horas após o AVCi, há um aumento nas citocinas pró-inflamatórias circulantes (IL-6 e TNF- α), que são produzidas principalmente a partir de células imunes periféricas ativadas (Ferrarese et al., 1999; Chapman et al., 2009).

Essa resposta pró-inflamatória aguda é rapidamente seguida por imunodepressão periférica, caracterizada por linfopenia, inativação de monócitos, depleção de células T esplênicas e células *natural killer* (NK), com redução do volume esplênico (Offner et al., 2006). Além disso, há diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , que são necessárias para defesa contra a infecção bacteriana e viral (Meisel et al., 2005; Choi et al., 2021).

Destaca-se adicionalmente com o AVCi a implicação sobre o eixo hipotálamo hipófise adrenal (HPA) e o sistema nervoso autônomo, ambos componentes da comunicação que envolve cérebro e sistema imune (Han et al., 2021). O eixo HPA é uma parte importante do sistema neuroendócrino que regula a função do corpo através da liberação de hormônios liberadores de corticotrofina do hipotálamo. É amplamente aceito que os glicocorticóides têm efeitos antiinflamatórios. Além disso, evidências anteriores demonstraram que os glicocorticóides têm fortes efeitos pró-apoptóticos e antiprolifrativos nos linfócitos T. Todas as propriedades dos glicocorticóides contribuem para os seus efeitos antiinflamatórios que levam à imunossupressão pós-AVC. Finalmente, a ativação do eixo HPA pode induzir imunossupressão em camundongos, aumentando a atividade endógena dos corticosteróides (Chen et al., 2016).

O sistema nervoso simpático (SNS) é superativado dentro de 1 a 3 dias no pós-AVCi, induzindo imunossupressão. As catecolaminas incluem principalmente três substâncias, epinefrina, norepinefrina e dopamina, que são mediadores do SNS secretados pela medula adrenal e terminações nervosas de órgãos periféricos quando o SNS é ativado (Zuo et al., 2016). O baço é inervado pelos neurônios noradrenérgicos do nervo esplênico, que são regulados pelos neurônios colinérgicos do nervo vago. Além disso, as catecolaminas circulantes modulam a resposta das células imunes. Portanto, há um sutil equilíbrio simpático/parassimpático na resposta imune do baço após o AVCi (Hoover et al., 2017).

Em relação ao sistema gastrointestinal, o SNS pode ser deletério, por interromper a produção de mucina, aumentar a permeabilidade intestinal e alterar a composição da microbiota intestinal (Liu et al., 2019; Choi et al., 2021). Ocorrendo redução da atividade do nervo parassimpático após uma lesão cerebral aguda ocorre o estímulo da proliferação bacteriana intestinal e aumento a translocação bacteriana (Sinagra et al., 2021).

Pacientes com AVCi que exibem sinais de imunossupressão comumente adquirem infecções. As infecções pós-AVCi podem ocorrer dentro de um dia após o início da imunossupressão associada à linfopenia. Além disso, a linfopenia pode ser observada em pacientes dentro de 6 horas após o AVCi e mantida por pelo menos uma semana e até meses (Haeusler et al., 2008). A imunossupressão também pode ser prontamente observada na diminuição do volume de órgãos imunológicos como visto no baço e timo em 12 horas após o modelo animal de AVCi em camundongos (Prass et al., 2003).

1.4 COMPROMETIMENTO DE ÓRGÃOS PERIFÉRICOS PÓS-AVCi E SEPSE

A consequência direta da imunossupressão induzida pelo AVCi torna os pacientes mais vulneráveis a infecções, das quais a pneumonia é a mais comum e muitas vezes fatal (Vermeij et al., 2013). Foi demonstrado que cerca de 1/10 dos pacientes com AVCi desenvolvem pneumonia na fase aguda (Badve et al., 2019). Além disso, o edema pulmonar neurogênico também é uma das complicações pulmonares comuns. O seu mecanismo pode ser proveniente do dano da barreira alveolar capilar causada por um grande número de descargas do sistema nervoso após a lesão craniocerebral grave e sobrecarga de volume pulmonar causada pelo aumento da resistência vascular sistêmica (Zhao et al., 2020).

Existe, no entanto, duas teorias principais sobre o mecanismo da fisiopatologia da pneumonia associada ao AVCi: teoria da aspiração e imunossupressão (Hannawi et al., 2013). A inalação de uma pequena quantidade de substâncias causada pela disfagia é um fator para a pneumonia associada ao AVCi, o que pode estar relacionado com a transmissão anormal de dopamina (Teramoto et al., 2009). O bloqueio dos receptores de dopamina D1 em cobaias pode inibir os reflexos de deglutição e reduzir a substância P em órgãos periféricos (Jia et al., 1998). Devido à diminuição da produção da dopamina na substância negra e no estriado de pacientes com AVCi, ocorre diminuição na expressão da substância P no nervo glossofaríngeo e gânglio parassimpático, resultando em disfagia (Teramoto et al., 2009).

Outra teoria discutida, é a imunossupressão induzida pelo AVCi e como resultado, a mudança do fenótipo de linfócitos Th1 para Th2, a diminuição de linfócitos e células NK no sangue e no baço, e o comprometimento do mecanismo

de defesa dos monócitos e neutrófilos (Faura et al., 2021). Assim como a ativação do SNS e o eixo HPA, resultando em linfopenia e inativação funcional de monócitos e Th1 (Dirnagl et al., 2007, Haeusler et al., 2008; Liesz et al., 2009). Adicionalmente, têm-se mostrado que existem interações entre a microbiota intestinal e o sistema nervoso central, que são chamados de eixo cérebro-intestino. Nesse sentido, o AVCi pode levar a destruição da barreira intestinal, aumentando a permeabilidade intestinal, com posterior passagem de patobiontes para a circulação sistêmica (Wen et al., 2017). A permeabilidade intestinal aumentada pode promover a infecção, e por fim a inflamação sistêmica que pode agravar diferentes sistemas já enfraquecidos em função do AVCi (Kelly et al., 2015).

A doença cardiovascular é considerada o fator de risco predisponente para AVCi e as complicações cardiovasculares também são a segunda causa de morte após o evento (Chen et al., 2017; Battaglini et al., 2020). Nos primeiros dias após o AVCi, complicações cardíacas são um problema comum, incluindo arritmia, insuficiência cardíaca, lesão miocárdica, doença coronária não fatal, síndrome de Takotsubo e outras doenças neurocardiogênicas (Iadecola et al., 2011; Barugh et al., 2014; Kelly et al., 2015). Alguns estudos mostraram mudanças estruturais ou funcionais da rede do sistema nervoso autônomo central após AVCi, e afetaram a frequência cardíaca e a contratilidade cardíaca através do SNS e parassimpático (Palma et al., 2014; Scheitz et al., 2018).

O hormônio liberador de corticotrofina secretado pelo núcleo paraventricular hipotalâmico, estimula a hipófise para liberar corticotrofina, que estimula a glândula adrenal para liberar o cortisol (Whitnall et al., 1993). Estudos com modelo animal de oclusão da artéria cerebral média em ratos verificaram que a ativação do núcleo paraventricular ocorre devido à ativação de NMDA pelo glutamato, o que leva à arritmia, com aumento de níveis plasmáticos de catecolaminas, o que pode levar à lesão miocárdica (Hachinski et al., 1986; Jia et al., 2015).

No que refere-se ao tecido hepático, na fase aguda do AVCi, o metabolismo da glicose e as proteínas implicadas na sinalização da insulina e do hormônio do crescimento no fígado são alterados. A lesão hepática induzida por AVCi e disfunção de hepatócitos estão associadas a distúrbios metabólicos, diminuição dos fatores de transcrição hepática e comprometimento da função imunológica do hospedeiro, síntese protéica e depuração de fatores de coagulação ativados. A insuficiência hepática é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, mas sua

associação com doenças cerebrovasculares, como AVCi, ainda é pouco investigada. Em um estudo recente, aproximadamente 61% dos pacientes sem história de disfunção hepatobiliar prévia apresentavam níveis anormais de enzimas hepáticas na admissão geral na unidade de terapia intensiva (UTI), e esse achado foi associado ao aumento da mortalidade em curto prazo (Alexander et al., 2018). Adicionalmente, foi verificado um aumento nos níveis de bilirrubina durante AVCi e sua associação com a gravidade dos sintomas (Pineda et al., 2008). Alterações durante a fase aguda do AVCi também foram relatadas para a gama-glutamil-transferase (Sevastos et al., 2005).

O baço também se torna alvo após o AVCi. Devido à função das quimiocinas e citocinas, o cérebro recruta um grande número de células imunes derivadas do baço para o local da lesão cerebral para estabelecer a resposta inflamatória (Ma et al., 2015; Liu et al., 2015). Diferentes estudos mostram que logo após o AVCi, o baço encolhe acentuadamente e o número de células no baço diminui (Sahota et al., 2013; Vahidy et al., 2016; Seifert et al., 2018). Logo após o AVC, a ativação do SNS leva a um aumento da norepinefrina e da epinefrina na circulação sistêmica. Em roedores, o baço encolhe após modelo experimental de oclusão da artéria cerebral média (MCAO), que pode ser devido à expressão do receptor α -1 adrenérgico no saco esplênico de ratos, que leva à contração esplênica após ativação (Seifert et al., 2018). Tanto a norepinefrina quanto a epinefrina têm demonstrado causar atrofia esplênica significativa (Mignini et al., 2003).

A alteração cardiovascular, pulmonar, hepática e esplênica tem sido vista após o AVCi e de forma semelhante, tais sistemas são alvo em uma das condições infecciosas após o AVCi, a sepse. A sepse é caracterizada por presença de infecção que interfere na regulação de órgãos e sistemas (Cecconi et al., 2018). De acordo com o último consenso internacional realizado pela *Society of Critical Care Medicine* e a *European Society of Critical Care Medicine*, denominado Sepsis-3, a sepse é definida como uma disfunção orgânica com risco de vida causada por uma resposta inflamatória sistêmica à presença de um patógeno (Singer et al., 2016). O choque séptico é definido quando a sepse ocorre com a presença de hipotensão, com necessidade de terapia para manter pressão arterial média (PAM) ≥ 65 mmHg associada a lactato ≥ 2 mmol/L, após adequada ressuscitação volêmica (Armstrong et al., 2017).

Pacientes internados em UTI com AVC possuem uma alta suscetibilidade a desenvolver um quadro de sepse, sendo maior em pacientes após AVCi (Ma et al., 2015; Zaid et al., 2019). Em modelo animal de AVCi, foi verificado aumento da permeabilidade intestinal com translocação bacteriana para órgãos como o pulmão, coração e cérebro, resultando em condições associadas a sepse em camundongos (Crapser et al., 2016).

Se tratando de uma condição sistêmica, a fisiopatologia da disfunção orgânica na sepse pode ser multifatorial e altamente complexa. Atualmente, a literatura elucida o papel do estresse oxidativo sobre o comprometimento funcional de órgãos periféricos na sepse (Margotti et al., 2022; Giustina et al., 2022).

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO EM ÓRGÃOS PERIFÉRICOS NA SEPSE

A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (Shami e Moreira., 2004). A produção contínua de radicais livres culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (Bianchi e Antunes., 1999).

A instalação do estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal mecanismo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (Halliwell e Whiteman., 2004). Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Tais mecanismos podem, especialmente, ser favorecidos pelos íons ferro e cobre (Koury e Donangelo., 2003). A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres (Green et al., 2004).

Na mitocôndria, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. A enzima catalisadora dessa reação é a

citocromo oxidase. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a referida enzima oxida quatro moléculas de citocromo *c* removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao O₂ para formar água. A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres. A redução univalente do O₂ são gerados os radicais superóxido (O₂•), hidroxila (OH•) e, ainda, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Koury e Donagelo., 2003). Além da capacidade do O₂• em participar de reações de geração de OH•, pode ainda, por meio da reação com o radical livre óxido nítrico (NO•), gerar a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito (ONOO), também potencialmente reativa (Green et al.,2004).

Os íons ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os capacitam como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres. A participação desses metais se dá, especialmente, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. A primeira diz respeito à geração de radical OH•, por meio da reação do H₂O₂ com os íons em questão, ao passo que, na segunda, estes íons catalisam a reação entre o H₂O₂ e o radical O₂•, a fim de gerar, da mesma forma, o radical OH• (Koury e Donangelo., 2003).

Outra importante fonte geradora de radicais livres são as enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases (NADPH). Essas se referem a proteínas transmembrana que têm a função de transferir os elétrons através das membranas celulares. Geralmente, o acceptor de elétrons é o oxigênio e, dessa forma, em decorrência desse mecanismo, gera-se o radical O₂• (Bernard e Krause., 2007).

Os ácidos graxos poli-insaturados contidos nas membranas celulares fazem com que essas espécies sejam potentes geradoras de radicais livres, alcoxila (LO•) e peroxila (LO₂•), por meio da lipoperoxidação. Assim, o radical OH•, por meio da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, desempenha importante papel na lipoperoxidação, sendo considerado o principal iniciador de tal reação (Welch et al., 2002).

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicalais. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de

ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicaais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (Koury e Donangelo., 2003).

Usualmente, esse sistema é dividido em enzimático e não-enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética. Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não-radicaais, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (Halliwell e Whiteman., 2004).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos. As enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de H_2O_2 . Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical $OH\bullet$, contra o qual não há sistema enzimático de defesa. Além de ser o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, tendo como consequência a alteração da função biológica das membranas celulares, esse radical é capaz de agir sobre as proteínas, alterando-as em relação à sua estrutura e/ou função biológica (Welch et al., 2002).

Considerando a potencialidade do radical $OH\bullet$ e o fato da não existência de defesa enzimática especializada, é de extrema importância a manutenção do perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes, com o propósito de promover a manutenção da integralidade celular (Rover et al., 2001).

Fortes evidências demonstram que o desequilíbrio entre a geração de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) e sua degradação pelo sistema antioxidante constituído pelas enzimas SOD, CAT e GPx, está presente na fisiopatologia da sepse e no dano em órgãos periféricos (Petronilho et al., 2016). As EROs e ERNs

promovem importantes efeitos pró-inflamatórios, incluindo dano endotelial, recrutamento de neutrófilos e disfunção mitocondrial que por fim tais mecanismos contribuem para a alta regulação do estresse oxidativo (Andrades et al., 2005).

Dessa forma, sabendo que o estresse oxidativo está associado tanto ao AVCi, quanto na sepse, e que a alteração da permeabilidade intestinal associada à translocação bacteriana pode ser uma fonte potencial de infecções sistêmicas, denota-se relevante a compreensão do papel do estresse oxidativo, em associado à infecção pós-AVCi em órgãos periféricos, a fim de ampliar o entendimento nos domínios diagnósticos, prognósticos e estratégias protetoras para a infecção pós-AVCi.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação entre a sepse pós-AVCi e o estresse oxidativo em órgãos periféricos em ratos *Wistar* machos e fêmeas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar o edema cerebral de ratos *Wistar* machos e fêmeas pós-AVCi e sepse;
- Avaliar a atividade da mieloperoxidase (MPO) no pulmão, fígado, coração, baço e soro de ratos *Wistar* machos e fêmeas induzidos a sepse pós-AVCi;
- Avaliar o nível de nitrito/nitrato no pulmão, fígado, coração, baço e soro de ratos *Wistar* machos e fêmeas induzidos a sepse pós-AVCi;
- Avaliar o dano oxidativo em lipídios e proteínas no pulmão, fígado, coração, baço e soro de ratos *Wistar* machos e fêmeas induzidos a sepse pós-AVCi;
- Avaliar a defesa antioxidante enzimática no pulmão, fígado, coração, baço e soro de ratos *Wistar* machos e fêmeas induzidos a sepse pós-AVCi.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram inclusos no estudo ratos *Wistar* machos e fêmeas de 60 dias de idade, e que não tenham sido utilizados em estudos anteriores, provenientes do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde permaneceram no Biotério da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL). Os animais estavam alojados em local fresco e arejado, em um ciclo de 12 horas claro/escuro, a uma temperatura de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com alimento e água sempre disponíveis. Após indução de isquemia/reperfusão, todos os animais receberam ração úmida (Crapser et al., 2016). Para coleta de amostras biológicas, após os experimentos todos os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação obedecendo as disposições da Resolução número (nº.) 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), de 20/06/2002.

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISUL com parecer de aprovação nº. 22.009.4.01.IV (anexo A). Os experimentos foram efetuados somente após a aprovação do CEUA e foram realizados de acordo com as diretrizes atuais para os cuidados de animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes no Brasil: Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA); Resolução Normativa nº 30 de 02 de fevereiro de 2016 e Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA).

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os desenhos experimentais remetem às avaliações *in vivo* utilizando modelo experimental de MCAO para indução de isquemia cerebral e modelo experimental de CLP para indução de sepse. Os grupos foram aleatoriamente divididos em: sham+sham machos (n=6), sham+sham fêmeas (n=6), MCAO+sham machos (n=10), MCAO+sham fêmeas (n=10), sham+CLP machos (n=12), sham+CLP fêmeas (n=12), MCAO+CLP machos (n=14), MCAO+CLP fêmeas (n=14), totalizando 84 animais. Os animais foram submetidos ao modelo experimental de AVCi pelo

modelo experimental de MCAO por 60 minutos ou sham. Após 7 dias de reperfusão foram submetidos à sepse pelo modelo experimental de CLP ou sham e em 24h após anestesiados com cetamina e xilazina (80 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente) e realizada a punção cardíaca para retirada do soro seguido por decapitação em guilhotina, foi retirado o cérebro total, amostras de pulmão, fígado, coração e baço (Crapser et al., 2016).

3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE AVCi

O AVCi foi induzido utilizando a técnica de MCAO (Li et al., 2013). Os animais foram anestesiados com isoflurano (Cristália, Brasil) (1 L/min de O₂ e 1 L/min O₂ ambiente), e mantidos sob anestesia utilizando o fluxo de 1 – 2% de isoflurano com vaporizador de kit de anestesia (Hipnos 50 I, Previtch, Brasil). Foi realizada tricotomia na região cervical ventral e em seguida assepsia com clorexidina 4%. A incisão foi no local asséptico no pescoço na linha média ventral. Para a MCAO unilateral foi inserido um monofilamento revestido com borracha de silicone na artéria carótida interna direita a 6 mm da bifurcação da artéria carótida interna através de um coto da artéria carótida externa. Em seguida, fechou-se o plano cirúrgico com fio de sutura nylon 3-0 (Shalom, Brasil) e a isquemia cerebral induzida teve duração de 60 minutos de MCAO. Os animais sham foram submetidos ao mesmo procedimento, exceto a oclusão da artéria carótida interna. Após 60 minutos de MCAO, sob anestesia, a oclusão foi removida para permitir a reperfusão. A temperatura foi monitorada e mantida a aproximadamente 37 °C durante a cirurgia e isquemia (McCullough et al., 2003).

3.4 MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE

A sepse foi induzida usando a técnica de CLP (Fink e Heard., 1990). Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (Syntec, Brasil) (80 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal, sendo submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal. O ceco foi ligado logo abaixo da junção ileocecal com fio seda 3-0 (Shalom, Brasil), mantendo assim a continuidade intestinal. Logo após, o ceco foi perfurado com uma agulha n^o. 14 na face antimesentérica e sutilmente comprimidos até a extrusão de conteúdo fecal. Os planos cirúrgicos foram

fechados com fio de sutura nylon 3-0 (Shalom, Brasil) e os animais observados em caixa de recuperação por duas horas. O grupo sepse recebeu “suporte básico” de salina em 50 mL/kg imediatamente e 12 horas após CLP e ceftriaxona (Amplopec, Brasil) em 30 mg/kg a cada 12 horas, em um total de 24 horas. O grupo controle (sham) foi submetido à laparotomia, porém o ceco manipulado pelo mesmo período, mas não houve ligação ou perfuração. O grupo sham recebeu somente salina, 50 mL/kg, imediatamente e 12 horas após a cirurgia, sendo o volume de salina corresponde à administração do antibiótico ao grupo CLP. Após o procedimento cirúrgico, todos os animais receberam uma injeção intramuscular de 80 mg/kg de dipirona sódica para analgesia.

3.5 EDEMA CEREBRAL

A avaliação do edema cerebral foi realizada pelo método de secagem e pesagem com base no registro do teor de água no cérebro. Imediatamente após eutanásia o encéfalo foi isolado e o tecido cerebral colocado sobre um papel filtro para remoção do excesso de água. Posteriormente os mesmos foram pesados em balança analítica de precisão (Bel, S203H, Brasil, com sensibilidade 0,01 g) e colocados em cápsulas de porcelana, previamente seca em estufa. Em seguida, o tecido cerebral na cápsula de porcelana foi colocado em uma incubadora com temperatura e umidade constantes durante 24 h a 100 °C. Após 24 h o cérebro seco na cápsula de porcelana foi pesado novamente. A porcentagem de água foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: % de H₂O = [(peso úmido - peso seco) / peso úmido] X 100 (Durmaz et al., 2003).

3.6 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

As amostras de soro, baço, pulmão, fígado e coração foram removidas e armazenadas em freezer a menos 80 °C para as análises de estresse oxidativo. Todas as mensurações neuroquímicas foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas, de acordo com o método descrito por Lowry *et al*, baseado na reação de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, EUA) expressas como nmol/min/mg de proteína (Lowry et al., 1951).

3.6.1 Atividade da mieloperoxidase

O indicativo de infiltrado de neutrófilos e produção de EROs pode ser avaliado por meio da atividade da MPO (Amanzada et al., 2011). Os tecidos obtidos foram homogeneizados (50 mg/mL) em 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (SIGMA_ALDRICH, EUA) e centrifugado a 15.000 g durante 40 minutos. A suspensão foi sonicada três vezes durante 30 segundos. Uma parte do sobrenadante foi misturada com solução de tetrametilbenzidina 1,6 mM (Sigma-Aldrich, EUA) e 1 mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A atividade foi medida como a variação de absorbância a 650 nm a 37 °C (De Young et al., 1989). Os resultados foram expressos em mU/mg de proteína.

3.6.2. Determinação de nitrito/nitrato

A concentração de nitrito/nitrato foi mensurada por meio da reação de Griess, pela adição de 100 µL de reagente de Griess [0,1% (w/v) naftil etilenodiamina dicloridrato em H₂O e 1% (p/v) sulfanilamida em 5% (v/v) H₃PO₄ em volume concentrado (1:1)] para 100 µL de amostra. A densidade óptica foi medida a 550 nm usando um espectrofotômetro. Os resultados expressos como nmol/mg de proteína (Green et al., 1982).

3.6.3. Avaliação de dano oxidativo aos lipídios e proteínas

O índice de dano oxidativo em lipídios foi avaliado pela técnica de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Draper et al., 1990). As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato e foram desproteinizadas com o ácido tricloroacético 10% com centrifugação à 1.000rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado ácido tiobarbitúrico 0,67% (Sigma-Aldrich, EUA) e em seguida foi incubado a 100 °C em banho-maria por 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em 532 nm em espectrofotômetro utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído nmol/mg de proteína.

O índice de dano oxidativo às proteínas foi quantificado pela reação dos grupamentos carbonilados com dinitrofenilhidrazina (Levine et al., 1990). As

proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético 20% (Vetec) e redissolvidas em dinitrofenilhidrazina (Sigma-Aldrich, EUA). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 340 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

3.6.4. Enzimas antioxidantes

A atividade enzimática da CAT foi determinada pela diminuição no consumo de peróxido de hidrogênio. A leitura da amostra foi realizada em leitora de microplacas a 240 nm, nos tempos 0, 30 e 60 segundos. A atividade da CAT foi expressa em U de CAT/mg de proteína (Aebi., 1984).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises bioquímicas, os dados foram apresentados como média \pm DP e analisados por ANOVA, seguido de teste *post hoc* Tukey. Os valores foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$. Todas as análises foram executadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.

4 RESULTADOS

4.1 EDEMA CEREBRAL

Conforme demonstrado na figura 2, foi encontrado um aumento significativo no edema cerebral nos animais machos submetidos a MCAO+sham e a MCAO+CLP em comparação aos animais do grupo sham+sham. O grupo MCAO+CLP apresentou uma potencialização no edema cerebral em comparação com os grupos sham+CLP e MCAO+sham. Em relação as fêmeas, não foram encontrados resultados significativos entre os grupos.

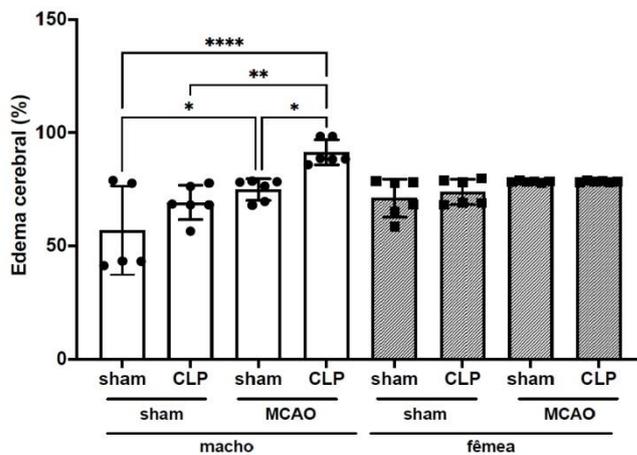


Figura 2: Gráfico com os resultados de edema cerebral, sham+sham machos (n=6), sham+sham fêmeas (n=6), MCAO+sham machos (n=10), MCAO+sham fêmeas (n=10), sham+CLP machos (n=12), sham+CLP fêmeas (n=12), MCAO+CLP machos (n=14), MCAO+CLP fêmeas (n=14). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (ANOVA seguido de teste *post hoc* Tukey).

4.2 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

Em relação a MPO, nos machos, percebe-se no soro (Figura 3A), pulmão (Figura 3B), coração (Figura 3C), fígado (Figura 3D) e baço (Figura 3E) um aumento na atividade da MPO apenas no grupo MCAO+CLP comparado com todos os outros grupos (Figura 3). Nas fêmeas não foram encontrados resultados significativos entre os grupos, mas percebe-se uma diminuição da atividade de MPO nas fêmeas do grupo MCAO+CLP no soro, pulmão e baço comparado aos machos.

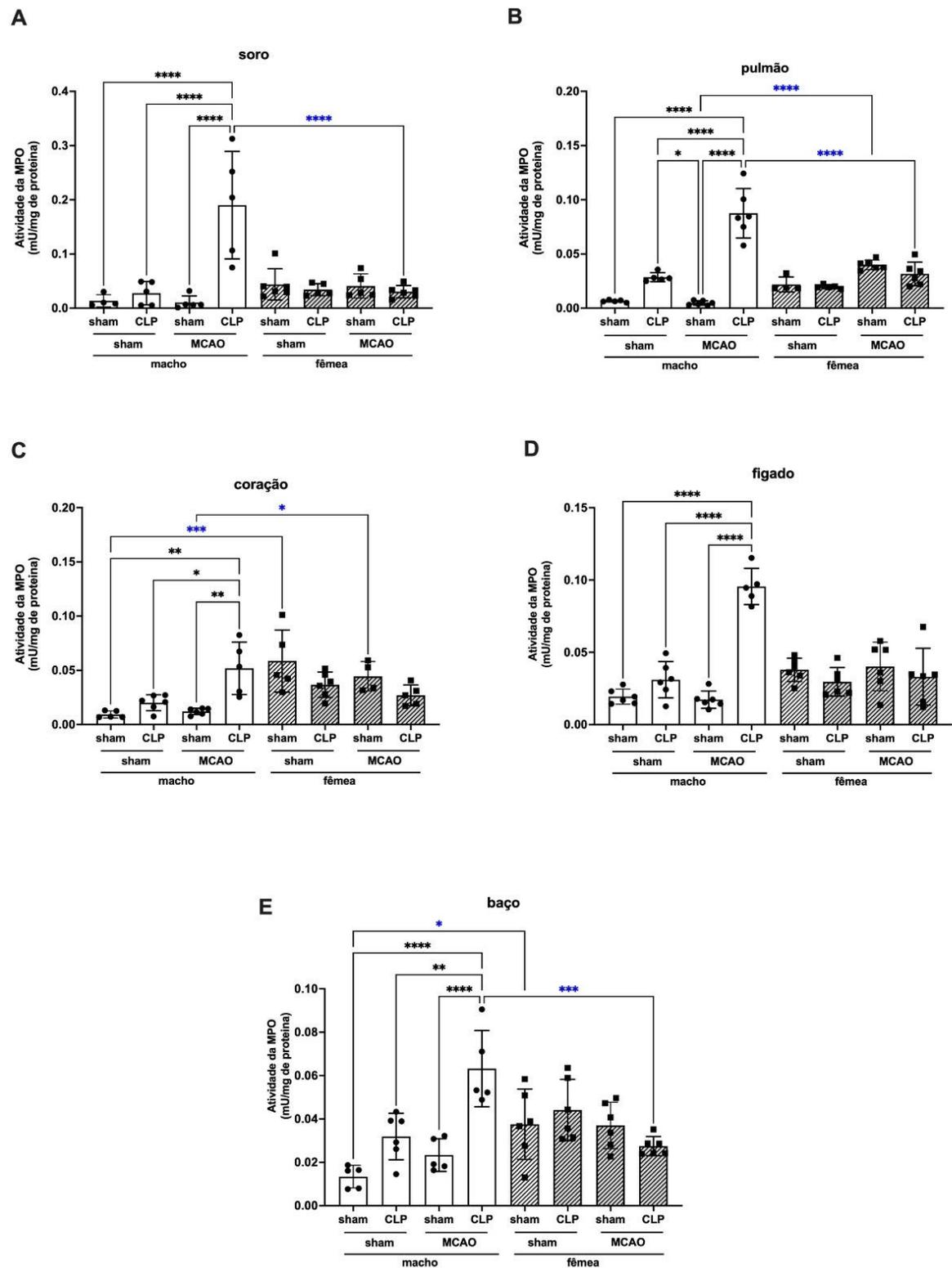


Figura 3: Gráfico com os resultados de atividade da mieloperoxidase no soro, pulmão, coração, fígado e baço, sham+sham machos (n=6), sham+sham fêmeas (n=6), MCAO+sham machos (n=10), MCAO+sham fêmeas (n=10), sham+CLP machos (n=12), sham+CLP fêmeas (n=12), MCAO+CLP machos (n=14), MCAO+CLP fêmeas (n=14). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ entre os grupos do mesmo sexo e * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ entre machos e fêmeas do mesmo grupo (ANOVA seguido de teste *post hoc* Tukey).

4.3 DETERMINAÇÃO DE NITRITO/NITRATO

Em relação aos níveis de nitrito/nitrato no soro (Figura 4A), nas fêmeas, percebe-se um aumento no grupo sham+CLP e uma potencialização no grupo MCAO+CLP comparado a todos os outros grupos de fêmeas. No soro houve um aumento de nitrito/nitrato em fêmeas comparando-se aos machos nos grupos sham+CLP, MCAO+sham e MCAO+CLP.

Em relação ao pulmão (Figura 4B), nos machos, aumentou a concentração de nitrito/nitrato no grupo MCAO+CLP em relação aos demais grupos de machos. Nas fêmeas, no pulmão, aumentou a concentração de nitrito/nitrato no grupo MCAO+CLP em relação ao grupo MCAO+sham. Além disso, uma diferença foi verificada entre os sexos com aumento de nitrito/nitrato nas fêmeas comparando-se aos machos nos grupos sham+sham e sham+CLP.

No coração (Figura 4C), nas fêmeas, aumentou a concentração de nitrito/nitrato no grupo MCAO+CLP em relação aos demais grupos, sendo esse aumento maior nas fêmeas do que nos machos. Em relação ao fígado (Figura 4D), nas fêmeas, aumentou os níveis de nitrito/nitrato nos grupos sham+CLP e MCAO+CLP em relação ao grupo sham+sham, e uma potencialização desse aumento no grupo MCAO+CLP em relação ao grupo MCAO+sham. No baço (Figura 4E), nas fêmeas, verificou-se um aumento de nitrito/nitrato em todos os grupos em relação ao grupo sham+sham e uma diminuição em MCAO+sham em relação a sham+CLP. Ainda no baço comparando machos e fêmeas, verificou-se um aumento de nitrito/nitrato em fêmeas nos grupos sham+CLP, MCAO+sham e MCAO+CLP. Nos grupos de machos, não foram encontrados resultados significativos no soro, coração, fígado ou baço entre os grupos.

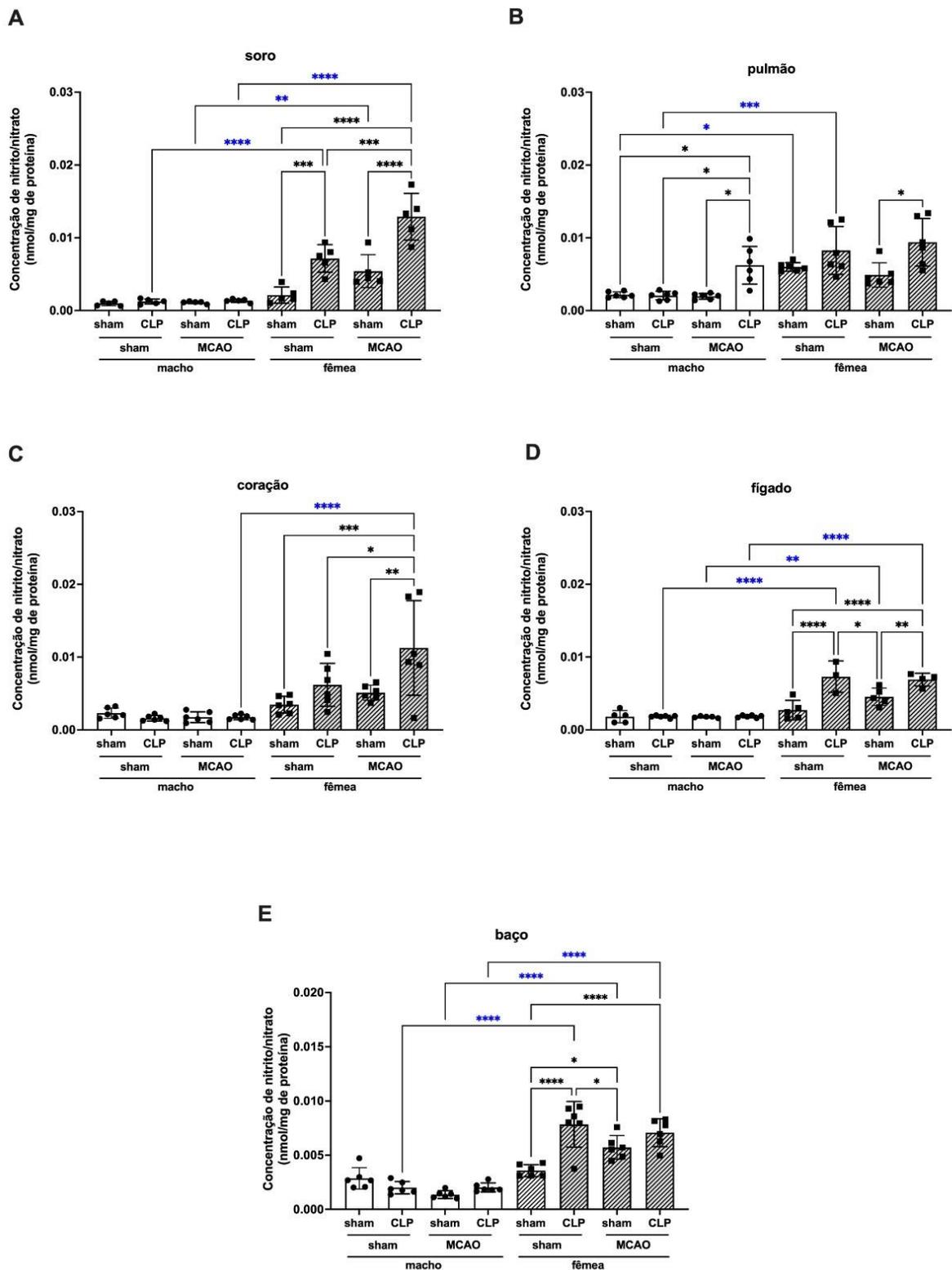


Figura 4: Gráfico com os resultados de concentração de nitrito/nitrato no soro, pulmão, coração, fígado e baço, sham+sham machos (n=6), sham+sham fêmeas (n=6), MCAO+sham machos (n=10), MCAO+sham fêmeas (n=10), sham+CLP machos (n=12), sham+CLP fêmeas (n=12), MCAO+CLP machos (n=14), MCAO+CLP fêmeas (n=14). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ entre os grupos do mesmo sexo e * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ entre machos e fêmeas do mesmo grupo (ANOVA seguido de teste *post hoc* Tukey).

4.4 AVALIAÇÃO DE DANO OXIDATIVO AOS LIPÍDIOS E PROTEÍNAS

Em relação ao dano em lipídios no soro (Figura 5A), nas fêmeas, aumentou equivalente de MDA somente no grupo MCAO+CLP em relação ao grupo sham+sham. No pulmão (Figura 5B), nas fêmeas aumentou equivalente de MDA nos grupos sham+CLP e MCAO+CLP em relação ao grupo sham+sham e comparando machos e fêmeas um aumento em MCAO+CLP foi verificado em fêmeas. No coração (Figura 5C) os resultados não foram significativos enquanto no fígado (Figura 5D), nos machos, aumentou equivalente de MDA somente no grupo MCAO+CLP em relação ao grupo sham+sham. Em relação as fêmeas, aumentou equivalente de MDA nos grupos sham+CLP e MCAO+CLP em relação ao grupo sham+sham. No baço (Figura 5E) os resultados entre os grupos e entre os sexos não foram significativos.

Em relação aos resultados de proteínas carboniladas, foi encontrado um aumento no soro (Figura 6A) no grupo MCAO+sham nos machos comparado ao grupo MCAO+sham nas fêmeas. Quando comparado entre os grupos de machos ou entre os grupos de fêmeas, não apresentam diferenças significativas. No pulmão (Figura 6B), nos machos, verifica-se um aumento da proteína carbonilada nos grupos sham+CLP e MCAO+CLP em relação ao grupo sham+sham, e que no grupo MCAO+CLP potencializou esse aumento comparado aos grupos sham+CLP e MCAO+sham. Apresentou ainda uma diminuição nos grupos sham+CLP e MCAO+CLP nas fêmeas comparando-se aos machos. No coração (Figura 6C) aumentou proteína carbonilada no grupo MCAO+sham nos machos comparado ao grupo MCAO+sham nas fêmeas. No fígado (Figura 6D) aumentou proteína carbonilada no grupo MCAO+CLP em relação ao grupo sham+CLP. No baço (Figura 6E), nos machos, aumentou proteína carbonilada nos grupos sham+CLP e MCAO+CLP em relação a sham+sham e MCAO+sham. Comparando machos e fêmeas, percebe-se um aumento da proteína carbonilada no grupo MCAO+CLP nos machos comparado ao grupo MCAO+CLP nas fêmeas.

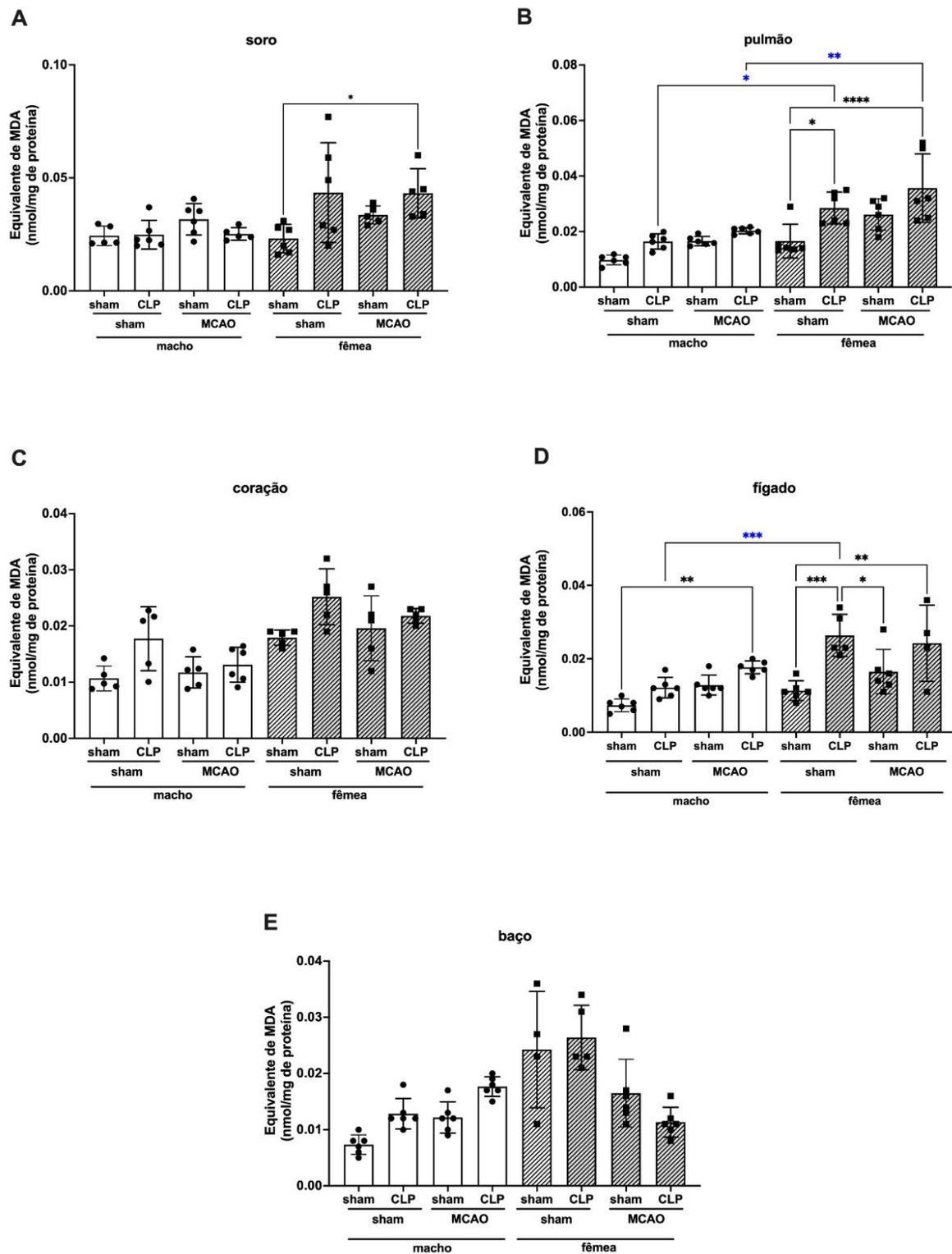


Figura 5: Gráfico com os resultados de equivalente de MDA no soro, pulmão, coração, fígado e baço, sham+sham machos (n=6), sham+sham fêmeas (n=6), MCAO+sham machos (n=10), MCAO+sham fêmeas (n=10), sham+CLP machos (n=12), sham+CLP fêmeas (n=12), MCAO+CLP machos (n=14), MCAO+CLP fêmeas (n=14). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ entre os grupos do mesmo sexo e * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ entre machos e fêmeas do mesmo grupo (ANOVA seguido de teste *post hoc* Tukey).

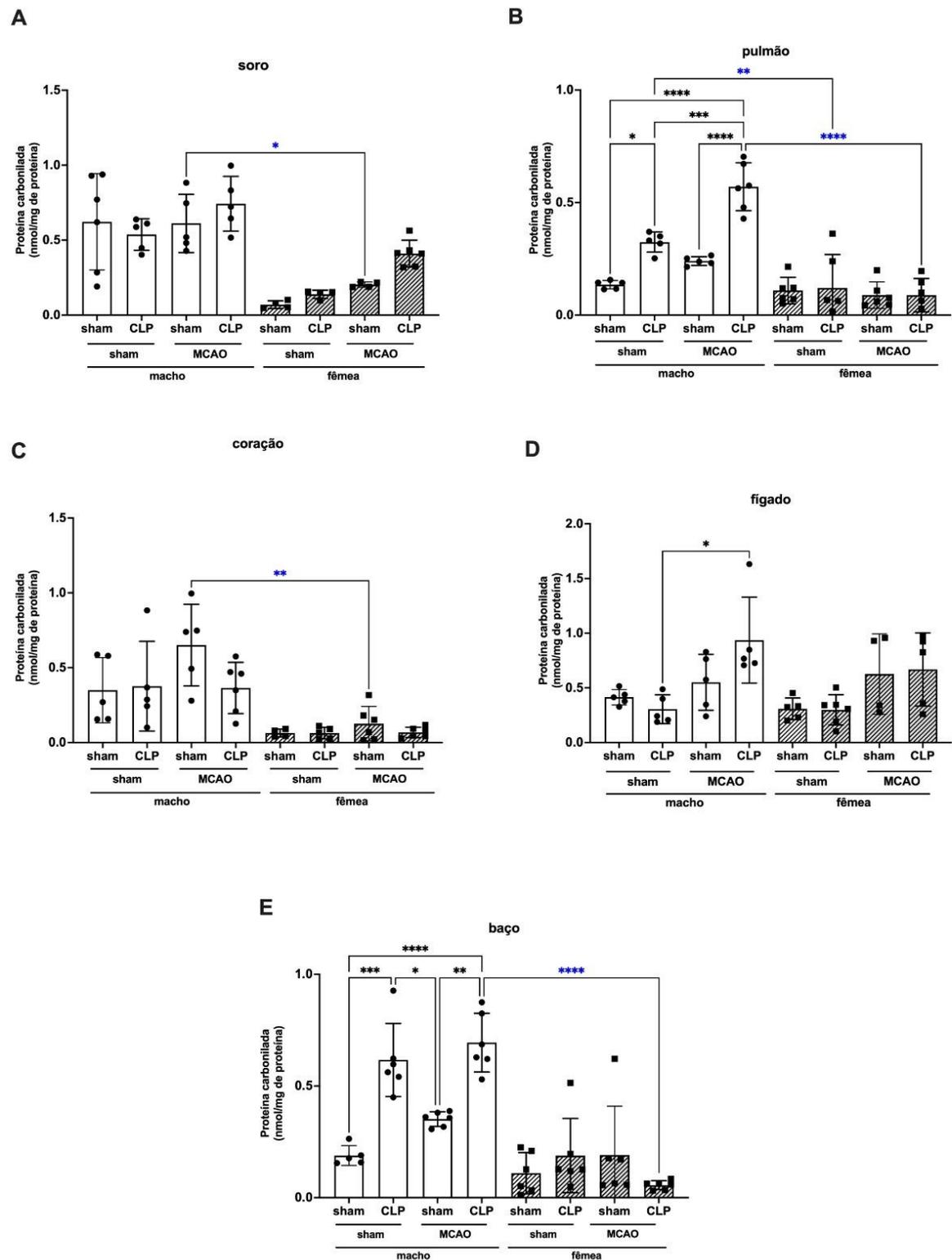


Figura 6: Gráfico com os resultados de proteína carbonilada no soro, pulmão, coração, fígado e baço, sham+sham machos (n=6), sham+sham fêmeas (n=6), MCAO+sham machos (n=10), MCAO+sham fêmeas (n=10), sham+CLP machos (n=12), sham+CLP fêmeas (n=12), MCAO+CLP machos (n=14), MCAO+CLP fêmeas (n=14). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ entre os grupos do mesmo sexo e * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ entre machos e fêmeas do mesmo grupo (ANOVA seguido de teste *post hoc* Tukey).

4.5 ATIVIDADE DA CATALASE

Em relação a catalase no soro (Figura 7A) e no pulmão (Figura 7B), nas fêmeas, diminuiu atividade da catalase nos grupos sham+CLP e MCAO+CLP em relação ao grupo sham+sham. Além disso, houve uma diminuição de MCAO+CLP em relação a MCAO+sham no soro das fêmeas. Nos grupos de machos, não foram encontrados resultados significativos no soro ou no pulmão entre os grupos. No coração (Figura 7C), nos machos, diminuiu atividade da catalase no grupo MCAO+CLP em relação ao grupo sham+sham. Nas fêmeas, no coração, diminuiu atividade da catalase nos grupos sham+CLP e MCAO+CLP em relação ao grupo sham+sham e MCAO+CLP em relação a MCAO+sham. No fígado (Figura 7D), nos machos, diminuiu atividade da catalase de todos os grupos em relação ao grupo sham+sham. Nas fêmeas, no fígado, diminuiu atividade da catalase nos grupos MCAO+sham e MCAO+CLP em relação ao grupo sham+sham. No baço (Figura 7E), nas fêmeas, diminuiu atividade da catalase de todos os grupos em relação ao grupo sham+sham. Nos grupos de machos, não foram encontrados resultados significativos entre os grupos.

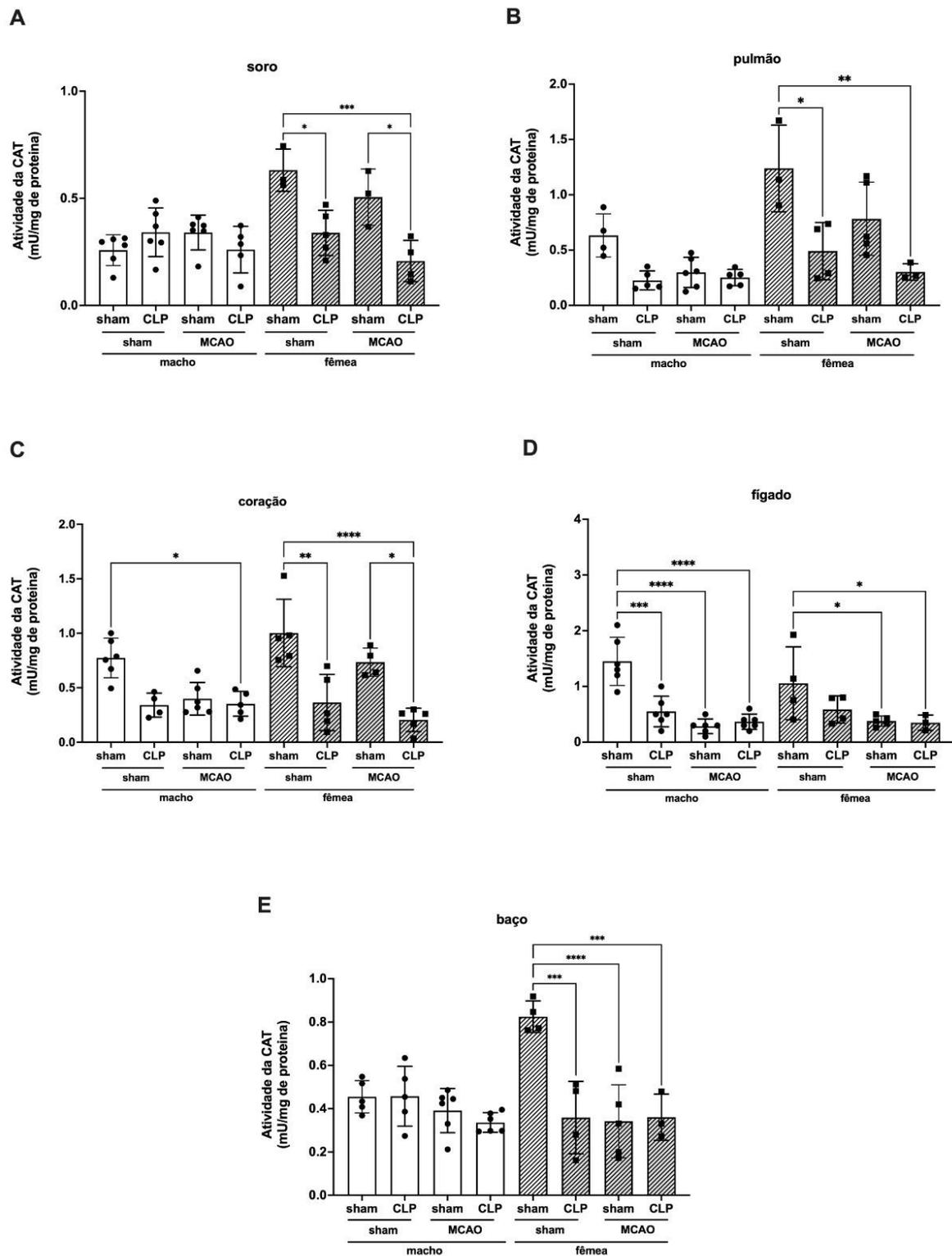


Figura 7: Gráfico com os resultados de atividade da CAT no soro, pulmão, coração, fígado e baço, sham+sham machos (n=6), sham+sham fêmeas (n=6), MCAO+sham machos (n=10), MCAO+sham fêmeas (n=10), sham+CLP machos (n=12), sham+CLP fêmeas (n=12), MCAO+CLP machos (n=14), MCAO+CLP fêmeas (n=14). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 entre os grupos do mesmo sexo (ANOVA seguido de teste *post hoc* Tukey).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar a diferença do sexo sobre a sepse após o AVCi em ratos *Wistar* machos e fêmeas na avaliação do edema cerebral e estresse oxidativo em órgãos periféricos e soro utilizando modelos pré-clínicos bem estabelecidos. Dessa forma, foi verificado uma potencialização do aumento de edema cerebral em ratos machos quando induzidos a sepse pós-AVCi sobre animais submetidos somente ao AVCi. Em relação ao efeito da sepse pós-AVCi em órgãos periféricos e soro, foi encontrado somente em machos um aumento da atividade da MPO como indicativo de infiltrado de neutrófilos em diferentes órgãos e no soro em animais submetidos a sepse pós-AVCi. Tais resultados não foram seguidos nos níveis de nitrito/nitrato onde a potencialização de sepse pós-AVCi foi mais evidente em fêmeas. Por fim, em relação ao estresse oxidativo, houve uma variabilidade no que se refere ao sexo, onde de maneira geral percebeu-se um aumento de parâmetros de estresse oxidativo somente em animais submetidos a sepse pós-AVCi ou com aumento potencializado nesse grupo em relação aos demais.

O AVCi tem efeitos profundos na resposta imune central e periférica (Crapser et al., 2016). A neuroinflamação caracterizada pela ativação microglial também está associada ao aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, resultando no recrutamento de leucócitos ativados derivados do sangue em direção ao cérebro (Mathias et al., 2023). Este processo de recrutamento é modulado por várias moléculas de adesão celular e citocinas. Quando induzidas, as citocinas agem sobre o endotélio vascular para aumentar a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), P-selectina e E-selectina, levando a um maior acúmulo local e adesão de leucócitos ativados com potencialidade de liberarem componentes causadores de lise celular (Gauberti et al., 2018; Mathias et al., 2023).

Paralelo a isso, indivíduos com AVCi que necessitam de tratamento em UTI devido à gravidade da doença, têm um mau prognóstico e são propensos a diversas complicações funcionais e neurológicas (Chamorro et al., 2007; Zheng et al., 2017; Sebastian et al., 2019). Entre os desencadeantes de tais complicações estão as infecções pós-AVCi (Zheng et al., 2017). Além de prolongar a internação hospitalar, as infecções são um fator de risco estabelecido e responsáveis por aproximadamente 20% das mortes e elevada morbidade com potencialização do

dano neurológico já estabelecido (Rocco et al., 2013; Giede-Jeppe et al., 2016). Nesse contexto, no presente estudo o dano cerebral se mostrou mais evidente em machos de acordo com a análise de edema cerebral sendo potencializado quando expostos a uma infecção grave após AVCi como a sepse.

A literatura nos mostra que as mulheres sofrem AVCi mais graves do que homens, o que resulta em mais limitações físicas, pior saúde mental e maior dependência em longo prazo (Gall et al., 2010). De acordo com o *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS), as mulheres apresentam uma prevalência maior de desenvolverem quadros de AVCi agudo e severo, além de apresentarem recuperação mais lenta, em relação aos homens (Haast et al., 2012).

De fato, sabe-se que o sexo do indivíduo é um fator de risco não modificável tanto para o AVCi assim como para a sepse, mas também, que a influência do sexo sobre o risco de dessas condições muda ao longo da vida (Roy-O'Reilly e McCullough., 2018). A associação da severidade sobre uma recuperação mais lenta nas mulheres se dá principalmente após a menopausa com a diminuição dos níveis de estrogênio e antes disso, os homens são mais propensos a apresentarem mais sequelas pós-AVCi (Tariq et al., 2023). Tais respostas podem explicar o fato de que foi encontrado um aumento de edema cerebral em machos visto que foram utilizados ratos com idade equivalente a um adulto jovem. Talvez esse seja um fator limitante no presente estudo, por outro lado a utilização de ratos adultos jovens e não em idosos onde o AVCi é mais prevalente, se deve em parte à dificuldade de realizar cirurgias em animais idosos aos altos custos dos animais e às baixas taxas de sobrevivência em animais idosos (Liu e McCullough., 2011).

Em resposta ao quadro de AVCi e aos danos sistêmicos provocados, ocorre uma depressão do sistema imunológico e a ativação de respostas adaptativas, que de fato levam a um impacto negativo que é o aumento na incidência de infecções, sendo um fator desencadeante para sepse (Crapser et al., 2016). A fisiopatologia da disfunção orgânica induzida pela sepse envolve questões multifatoriais e complexas, incluindo a ativação e migração desordenada de neutrófilos de forma sistêmica (Margotti et al., 2022). Nesse sentido a MPO, uma enzima específica armazenada em grânulos de neutrófilos, serve como indicativo de infiltração de neutrófilos e gravidade da inflamação, além de produção de moléculas oxidantes em condições em que existe a ativação de neutrófilos (Islam e Takeyama., 2023).

Em resposta a uma infecção ou inflamação, gradientes quimiotáticos promovem a adesão de neutrófilos às células endoteliais e quimiotaxia ao local da injúria, como ocorre na sepse e AVCi (Petronilho et al., 2012; Li et al., 2022). A avaliação da MPO periférica seguiu os resultados de edema cerebral no que se refere a suscetibilidade ao sexo. Foi verificado no soro um aumento de MPO somente em machos quando submetidos a sepse pós-AVCi, indicando uma ativação sistêmica de neutrófilos. O mesmo resultado foi encontrado nos demais órgãos (pulmão, coração, fígado e baço). Houve ainda uma diminuição nos níveis de MPO nas fêmeas quando comparadas aos machos no grupo MCAO+CLP. Esses resultados vêm de encontro ao estudo realizado por Manwani et al., 2013 que mostrou que após modelo de AVCi a presença de neutrófilos ativados sistemicamente ocorre em maior quantidade em camundongos machos adultos em relação as fêmeas.

Ainda relacionado ao processo inflamatório, o nível de nitrito/nitrato pode ser utilizado como um indicativo indireto da formação de óxido nítrico (Joaquim et al., 2023). Nos ratos machos foram observados níveis elevados de nitrito/nitrato no pulmão quando submetidos a sepse pós-AVCi. Referente as fêmeas, foram detectados níveis elevados no soro e nos órgãos periféricos inclusive com potencialização da formação de nitrito/nitrato no soro e fígado. Comparando machos e fêmeas, foi evidente um aumento de nitrito/nitrato nas fêmeas em relação aos machos no soro, coração, fígado e baço. A expressão do gene do óxido nítrico tem sido implicada na diferença entre o sexo sobre a suscetibilidade ao AVCi nas mulheres (Howard et al., 2005). Castillo et al., 2000, num estudo clínico, mostraram que o aumento do NO no líquido cefalorraquidiano está associado a maior dano cerebral e deterioração neurológica precoce em fêmeas.

Quando em homeostase, o NO se apresenta em pequenas quantidades e executa suas tarefas benéficas, porém em estados de agressão ao organismo como na sepse e AVCi, ele se torna excessivo e as EROs fazem sua oxidação em peroxinitrito, sendo esse potencialmente reativo quando em altos níveis (Tharmalingam et al., 2017). Especificamente em relação aos pacientes sépticos, o aumento da ativação de neutrófilos e vasodilatação com o aumento de óxido nítrico, resulta em uma maior produção de EROs (Helan et al., 2022). Dessa forma, a produção excessiva de EROs associada a um comprometimento em sua neutralização por enzimas antioxidantes, um processo chamado estresse oxidativo,

pode danificar biomoléculas como os lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, contribuindo para a disfunção e falência de órgãos na sepse, especialmente o fígado, pulmões, coração e baço (Margotti et al., 2022).

Devido ao alto teor de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares, essas se tornam suscetíveis aos danos por EROs no processo chamado de peroxidação lipídica (Reddy., 2023). Os resultados da mensuração de peroxidação lipídica se mostraram elevados em sepse pós-AVCi sistemicamente (soro), pulmão e fígado nas fêmeas, enquanto nos machos, apenas no fígado. Tais respostas evidenciam que a associação das duas patologias leva à um maior dano oxidativo em lipídios quando comparadas isoladamente. Além disso, verificou-se um aumento de dano em lipídios na sepse e sepse pós-AVCi no fígado e pulmão respectivamente em fêmeas comparadas aos machos. Nesse contexto, um estudo realizado por Siotto et al., 2022, os níveis sistêmicos de marcadores de peroxidação lipídica foram maiores em fêmeas que em machos.

Esta claro que a peroxidação lipídica desempenha um papel crítico na morte celular, incluindo apoptose, autofagia e ferroptose (Reddy., 2023). Adicionalmente, a peroxidação lipídica desenvolve uma série de reações que geram compostos altamente reativos, peróxidos lipídicos capazes de propagar a geração de compostos reativos capazes levar a modificação de proteínas (Glorieux e Calderon., 2017). Assim, além da peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas também ocorre em função das modificações geradas pela produção excessiva de EROs tanto no AVCi assim como na sepse. Essa oxidação resulta na formação de proteínas modificadas, alterações da função celular e degradação de proteínas, podendo ocorrer oxidação diretamente por danos das EROs ou indiretamente por ataque das moléculas derivadas da peroxidação lipídica (Rodríguez-García et al., 2020). Por tal aspecto, as proteínas carboniladas são o principal composto resultante da oxidação de proteínas. Sabe-se que a formação da carbonila é relativamente difícil de ser induzida, em comparação com outras formações de proteínas derivadas da oxidação, por isso este marcador pode indicar a gravidade do processo oxidativo celular e até mesmo a disfunção protéica (Akagawa., 2021).

Se tratando da carbonilação protéica, os resultados mostraram que apenas os machos apresentaram diferenças entre os grupos sendo evidenciado no pulmão, fígado e baço quando os animais foram submetidos a sepse após o AVCi. Torna-se importante destacar que a carbonilação protéica ocorre apenas como resultado de

uma intensa formação de EROs (Requena et al., 1996; Akagawa., 2021). Já no coração não houve uma diferença significativa, indo ao encontro com achados prévios, talvez pelo fato de o fígado, pulmão e baço serem órgãos alvo quando se trata de fisiopatologia da sepse, sofrendo assim um maior dano (Petronilho et al., 2016; Strnad et al., 2016).

Comparando machos e fêmeas, verificou-se uma diminuição da proteína carbonilada em fêmeas comparadas aos machos quando submetidos ao AVCi no soro e coração. A diminuição dos níveis de proteínas carboniladas nas fêmeas comparadas aos machos também pode ser vista no pulmão e baço com sepse e sepse pós-AVCi.

Estudos pré-clínicos em murinos mostram que as fêmeas reagem ao estresse físico e psicológico com uma resposta hormonal mais forte e prolongada ao longo do tempo, sugerindo uma maior vulnerabilidade masculina a estímulos negativos (Cohen e Yehuda., 2011; Tiberi et al., 2023). Assim, na condição basal, um nível aumentado de EROs como H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ foi encontrado em células da musculatura vascular lisa de ratos machos em relação às fêmeas (Malorni et al., 2008). Outros estudos confirmam essa evidência, demonstrando que as mitocôndrias isoladas do cérebro e do fígado de ratos machos produziram 80% mais peróxidos da contraparte feminina da mesma idade, independentemente da taxa de consumo de oxigênio (Tiberi et al., 2023).

Uma vez que o estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes do tecido e as espécies reativas geradas, os resultados encontrados neste estudo indicam fortemente que a sepse potencializa a diminuição da atividade da CAT em animais submetidos a AVCi. Estas observações foram verificadas no soro, pulmão e baço em fêmeas e no coração e fígado em machos e fêmeas. Níveis relativamente baixos destas enzimas podem ser responsáveis, em parte, pela vulnerabilidade de cada tecido ao estresse oxidativo, bem como verificamos em nosso estudo (Requena et al., 1996).

Em relação a diferença entre machos e fêmeas nas respostas aos insultos em relação a atividade da CAT, é relatado que a atividade dependente de estrogênio ativa o eixo de sinalização NRF2 em vários tipos de células e aumenta a expressão da própria NRF2 (Chen et al., 2013; Wu et al., 2014; Pajares et al., 2017; Pomatto et al., 2018; Fão et al., 2019). Por outro lado, o estrogênio aumenta a atividade da glutationala peroxidase e glutationala reduzida, mas não indica uma síntese de CAT

(Wu et al., 2014). Além disso, ao contrário do efeito positivo que o estrogênio exerce na regulação da defesa antioxidante, após insultos oxidativos, a ativação de receptores de andrógenos pode resultar em um efeito pró ou anti-apoptótico, dependendo do contexto celular, e até mesmo exercer um efeito pró-oxidante em certas condições (Pierdominici et al., 2011; Pronsato et al., 2017; Tenkorang et al., 2018).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a diferença do sexo sobre a sepse após o AVCi em ratos Wistar machos e fêmeas na avaliação do edema cerebral e estresse oxidativo em órgãos periféricos e soro. Os dados encontrados indicam uma potencialização do aumento de edema cerebral em ratos machos induzidos a sepse pós-AVCi sobre animais submetidos somente ao AVCi. No efeito da sepse pós-AVCi em órgãos periféricos e soro, foi encontrado somente em ratos machos um aumento da atividade da MPO indicando infiltrado de neutrófilos em diferentes órgãos e no soro em animais submetidos a sepse pós-AVCi. Em relação ao estresse oxidativo houve uma variabilidade no que se refere ao sexo, onde percebeu-se um aumento de parâmetros de estresse oxidativo somente em animais submetidos a sepse pós-AVCi ou com aumento potencializado nesse grupo em relação aos demais.

Por fim, os animais submetidos ao modelo de AVCi tornam-se mais vulneráveis aos efeitos deletérios da sepse no que refere-se ao edema cerebral e ao estresse oxidativo sistêmico e em órgãos periféricos. Além disso, ocorre uma variabilidade de acordo com o parâmetro avaliado em relação a diferença de sexo. Tal resultado remete a possibilidade de futuras investigações mais direcionadas para o envolvimento das diferenças de gênero aplicadas aos parâmetros aqui avaliados.

REFERÊNCIAS

- Adams RJ, Albers G, Alberts MJ, Benavente O, Furie K, Goldstein LB, et al. Update to the AHA/ASA recommendations for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack. *Stroke*. 2008;39(5):1647-52.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
- Akagawa M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radic Res*. 2021;55(4):307-320.
- Albers GW, Marks MP, Kemp S, Christensen S, Tsai JP, Ortega-Gutierrez S, et al. Thrombectomy for stroke at 6 to 16 hours with selection by perfusion imaging. *N Engl J Med*. 2018;378(8):708-18.
- Alexander KS, Zakai NA, Lidofsky SD, Callas PW, Judd SE, Tracy RP, et al. Non-alcoholic fatty liver disease, liver biomarkers and stroke risk: the reasons for geographic and racial differences in stroke cohort. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194153.
- Amanzada A, Malik IA, Nischwitz M, Sultan S, Naz N, Ramadori G. Myeloperoxidase and elastase are only expressed by neutrophils in normal and in inflamed liver. *Histochem Cell Biol*. 2011;135(3):305–15.
- Andrades M, Ritter C, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. *J Surg Res*. 2005;125(1):68-72.
- Armstrong BA, Betzold RD, May AK. Sepsis and septic shock strategies. *Surg Clin North Am*. 2017;97(6):1339–79.
- Arsava EM, Helenius J, Avery R, Sorgun MH, Kim GM, Pontes-Neto OM, et al. Assessment of the predictive validity of etiologic stroke classification. *JAMA Neurol*. 2017;74(4):419–26.
- Badve MS, Zhou Z, van de Beek D, Anderson CS, Hackett ML. Frequency of post-stroke pneumonia: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int J Stroke*. 2019;14(2):125–36.
- Barugh AJ, Gray P, Shenkin SD, MacLulich AM, Mead GE. Cortisol levels and the severity and outcomes of acute stroke: a systematic review. *J Neurol*. 2014; 261(3):533–45.
- Battaglini D, Robba C, Lopes da Silva A, Dos Santos Samary C, Leme Silva P, Dal Pizzol F, et al. Brain-heart interaction after acute ischemic stroke. *Crit Care*. 2020; 24(1):163.
- Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2019;139(10):56-528.

- Bernard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007; 87(1):245-313.
- Beuker C, Strecker JK, Rawal R, Schmidt-Pogoda A, Ruck T, Wiendl H, et al. Immune cell infiltration into the brain after ischemic stroke in humans compared to mice and rats: a systematic review and meta-analysis. *Transl Stroke Res.* 2021; 12(6):976–90.
- Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr.* 1999;12(12):123-30.
- Boden-Albala B, Litwak E, Elkind MS, Rundek T, Sacco RL. Social isolation and outcomes post stroke. *Neurology.* 2005;64(11):1888-92.
- Bray EP, McMahon NE, Bangee M, Al-Khalidi AH, Benedetto V, Chauhan U, et al. Etiologic workup in cases of cryptogenic stroke: protocol for a systematic review and comparison of international clinical practice guidelines. *Syst Rev.* 2019;8(1):331.
- Castillo J, Rama R, Dávalos A. Nitric oxide-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2000;31(4):852-7.
- Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *Lancet.* 2018;392(10141):75-87.
- Chamorro A, Urra X, Planas AM. Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression. *Stroke.* 2007;38(3):1097-103.
- Chapman KZ, Dale VQ, Dénes A, Bennett G, Rothwell NJ, Allan SM, et al. A rapid and transient peripheral inflammatory response precedes brain inflammation after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(11):1764–8.
- Chen AL, Sun X, Wang W, Liu JF, Zeng X, Qiu JF, Liu XJ, Wang Y. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis contributes to the immunosuppression of mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):266.
- Chen CS, Tseng YT, Hsu YY, Lo YC. Nrf2-Keap1 antioxidant defense and cell survival signaling are upregulated by 17 β -estradiol in homocysteine-treated dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neuroendocrinology.* 2013;97(3):232-41.
- Chen CY, Shih YC, Hung YF, Hsueh YP. Beyond defense: regulation of neuronal morphogenesis and brain functions via Toll-like receptors. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):90.
- Chen Z, Venkat P, Seyfried D, Chopp M, Yan T, Chen J. Brain-heart interaction: cardiac complications after stroke. *Circ Res.* 2017;121(4):451–68.
- Choi YH, Laaker C, Hsu M, Cismaru P, Sandor M, Fabry Z. Molecular mechanisms of neuroimmune crosstalk in the pathogenesis of stroke. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17):9486.

Cohen H, Yehuda R. Gender differences in animal models of posttraumatic stress disorder. *Dis Markers*. 2011;30(2-3):141-50.

Crapser J, Ritzel R, Verma R, Venna VR, Liu F, Chauhan A, et al. Ischemic stroke induces gut permeability and enhances bacterial translocation leading to sepsis in aged mice. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(5):1049–63.

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.

Dirnagl U, Klehmet J, Braun JS, Harms H, Meisel C, Ziemssen T, et al. Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke*. 2007;38(2 Suppl):770–3.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186:421–31.

Durmaz R, Kanbak G, Akyüz F, Isiksoy S, Yücel F, Inal M, et al. Lazaroid attenuates edema by stabilizing ATPase in the traumatized rat brain. *Can J Neurol Sci*. 2003;30(2):143-9.

Easton JD, Saver JL, Albers GW, Alberts MJ, Chaturvedi S, Feldmann E, et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. *Stroke*. 2009;40(6):2276-93.

Fão L, Mota SI, Rego AC. Shaping the Nrf2-ARE-related pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ageing Res Rev*. 2019;54:100942.

Faura J, Bustamante A, Miro-Mur F, Montaner J. Stroke-induced immunosuppression: implications for the prevention and prediction of post-stroke infections. *J Neuroinflamm*. 2021;18(1):127.

Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, et al. Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the global burden of disease study 2010. *Lancet*. 2014;383(9913):245–55.

Feigin VL, Nguyen G, Cercy K, Johnson CO, Alam T, Parmar PG, et al. Global, regional, and country-specific lifetime risks of stroke, 1990 and 2016. *N. Engl. J. Med*. 2018;379(25):2429-37.

Ferrarese C, Mascarucci P, Zoia C, Cavarretta R, Frigo M, Begni B, et al. Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(9):1004–9.

- Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res.* 1990;49(2):186–96.
- Flippo KH, Gnanasekaran A, Perkins GA, Ajmal A, Merrill RA, Dickey AS, et al. AKAP1 protects from cerebral ischemic stroke by inhibiting Drp1-dependent mitochondrial fission. *J Neurosci.* 2018;38(38):8233–42.
- Gall S, Phan H, Madsen TE, Reeves M, Rist P, Jimenez M, et al. Focused update of sex differences in patient reported outcome measures after stroke. *Stroke.* 2018;49(3):531-535.
- Gall SL, Donnan G, Dewey HM, Macdonell R, Sturm J, Gilligan A, et al. Sex differences in presentation, severity, and management of stroke in a population-based study. *Neurology.* 2010;74(12):975-81.
- Gauberti M, Fournier AP, Docagne F, Vivien D, Martinez de Lizarrondo S. Molecular magnetic resonance imaging of endothelial activation in the central nervous system. *Theranostics.* 2018;8(5):1195-1212.
- Giede-Jeppe A, Bobinger T, Gerner ST, Madžar D, Sembill J, Lücking H, et al. Lymphocytopenia is an independent predictor of unfavorable functional outcome in spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2016;47(5):1239-46.
- Giustina AD, Rodrigues JF, Bagio E, Bonfante S, Joaquim L, Zarbato G, et al. Lung-brain crosstalk in sepsis: protective effect of prophylactic physical exercise against inflammation and oxidative stress in rats. *Mol Neurobiol.* 2022;59(6):3860-3872.
- Global Burden of Disease Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Neurol.* 2019;18(5):439-458.
- Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem.* 2017;398(10):1095-1108.
- Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 2004; 53(Suppl 1): 110-8.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131–8.
- Haast RA, Gustafson DR, Kiliaan AJ. Sex differences in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(12):2100-7.
- Hachinski VC, Smith KE, Silver MD, Gibson CJ, Ciriello J. Acute myocardial and plasma catecholamine changes in experimental stroke. *Stroke.* 1986;17(3):387–90.

Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2008;359(13):1317-29.

Haeusler KG, Schmidt WU, Fohring F, Meisel C, Helms T, Jungehulsing GJ, et al. Cellular immunodepression preceding infectious complications after acute ischemic stroke in humans. *Cerebrovasc Dis.* 2008;25(1-2):50–8.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2): 231-55.

Han D, Liu H, Gao Y, Feng J. Targeting brain-spleen crosstalk after stroke: new insights into stroke pathology and treatment. *CurrNeuropharmacol.* 2021;19(9):1590–605.

Hannawi Y, Hannawi B, Rao CP, Suarez JI, Bershad EM. Stroke-associated pneumonia: major advances and obstacles. *Cerebrovasc Dis.* 2013;35(5):430–43.

Helan M, Malaska J, Tomandl J, Jarkovsky J, Helanova K, Benesova K, et al. Kinetics of biomarkers of oxidative stress in septic shock: a pilot study. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(4):640.

Henriksson KM, Farahmand B, Åsberg S, Edvardsson N, Terént A. Comparison of cardiovascular risk factors and survival in patients with ischemic or hemorrhagic stroke. *Int J Stroke.* 2012;7(4):276–281.

Heron M. Deaths: leading causes for 2019. *Natl Vital Stat Rep.* 2021;70(9):1-114.

Hoover DB, Brown TC, Miller MK, Schweitzer JB, Williams DL. Loss of sympathetic nerves in spleens from patients with end stage sepsis. *Front Immunol.* 2017;8:1712.

Howard TD, Giles WH, Xu J, Wozniak MA, Malarcher AM, Lange LA, et al. Promoter Polymorphisms in the Nitric Oxide Synthase 3 Gene Are Associated With Ischemic Stroke Susceptibility in Young Black Women. *Stroke.* 2005;36(9):1848–1851.

Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med.* 2011;17(7):796–808.

Iadecola C, Buckwalter MS, Anrather J. Immune responses to stroke: mechanisms, modulation, and therapeutic potential. *J Clin Invest.* 2020;130(6):2777–88.

Islam MM, Takeyama N. Role of Neutrophil Extracellular Traps in Health and Disease Pathophysiology: Recent Insights and Advances. *Int J Mol Sci.* 2023 Oct;24(21):15805.

Jia S, Xia Q, Zhang B, Wang L. Involvement of the paraventricular nucleus in the occurrence of arrhythmias in middle cerebral artery occlusion rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2015;24(4):844-51.

- Jia YX, Sekizawa K, Ohri T, Nakayama K, Sasaki H. Dopamine D1 receptor antagonist inhibits swallowing reflex in guinea pigs. *Am J Physiol*. 1998;274(1):76–80.
- Joaquim LS, Danielski LG, Bonfante S, Biehl E, Mathias K, Denicol T, et al. NLRP3 inflammasome activation increases brain oxidative stress after transient global cerebral ischemia in rats. *Int J Neurosci*. 2023;133(4):375-388.
- Jurcau A, Ardelean AI. Oxidative stress in ischemia/reperfusion injuries following acute ischemic stroke. *Biomedicines*. 2022;10(3):574.
- Katzan IL, Thompson NR, Uchino K, Lapin B. The most affected health domains after ischemic stroke. *Neurology*. 2018;90(16):1364-1371.
- Kelly JR, Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G, Hyland NP. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:392.
- Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr*. 2003; 16(4):433-41.
- Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med*. 2009;7:97.
- 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(C):464–78.
- Li L, Yasmen N, Hou R, Yang S, Lee JY, Hao J, et al. Inducible prostaglandin E synthase as a pharmacological target for ischemic stroke. *Neurotherapeutics*. 2022;19(1):366-385.
- Li P, Gan Y, Sun BL, Zhang F, Lu B, Gao Y, et al. Adoptive regulatory T-cell therapy protects against cerebral ischemia. *Ann Neurol*. 2013;74(3):458–71.
- Liesz A, Hagmann S, Zschoche C, Adamek J, Zhou W, Sun L, et al. The spectrum of systemic immune alterations after murine focal ischemia: immunodepression versus immunomodulation. *Stroke*. (2009) 40(8):2849–58.
- Lisabeth LD, Brown DL, Hughes R, Majersik JJ, Morgenstern LB. Acute stroke symptoms: comparing women and men. *Stroke*. 2009;40(6):2031-6.
- Liu F, McCullough LD. Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:464701.
- Liu Q, Johnson EM, Lam RK, Wang Q, Bo Ye H, Wilson EN, et al. Peripheral TREM1 responses to brain and intestinal immunogens amplify stroke severity. *Nat Immunol*. 2019;20(8):1023–34.

- Liu ZJ, Chen C, Li FW, Shen JM, Yang YY, Leak RK, et al. Splenic responses in ischemic stroke: new insights into stroke pathology. *CNS Neurosci Ther.* 2015; 21(4):320–6.
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(5):399-415.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
- Ma S, Zhao H, Ji X, Luo Y. Peripheral to central: organ interactions in stroke pathophysiology. *Exp Neurol.* 2015;272:41–9.
- Madsen TE, Khoury JC, Leppert M, Alwell K, Moomaw CJ, Sucharew H, et al. Temporal trends in stroke incidence over time by sex and age in the GCNKSS. *Stroke.* 2020;51(4):1070-1076.
- Malorni W, Straface E, Matarrese P, Ascione B, Coinu R, Canu S, et al. Redox state and gender differences in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 2008;582(5):635-42.
- Manwani B, Liu F, Scranton V, Hammond MD, Sansing LH, McCullough LD. Differential effects of aging and sex on stroke induced inflammation across the lifespan. *Exp Neurol.* 2013;249:120-31.
- Margotti W, Goldim MPS, Machado RS, Bagio E, Dacoregio C, Bernades G, et al. Oxidative stress in multiple organs after sepsis in elderly rats. *Exp Gerontol.* 2022;160:111705.
- Mathias K, Machado RS, Stork S, Dos Santos D, Joaquim L, Generoso J, et al. Blood-brain barrier permeability in the ischemic stroke: An update. *Microvasc Res.* 2023;151:104621.
- McCullough LD, Blizzard K, Simpson ER, Öz OK, Hurn PD. Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *J Neurosci.* 2003;23(25):8701–5.
- Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(10):775–86.
- Mignini F, Streccioni V, Amenta F. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2003;23(1):1–25.
- Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, et al. Thrombectomy 6 to 24 Hours after stroke with a mismatch between deficit and infarct. *N Engl J Med.* 2018;378(1):11-21.
- Offner H, Subramanian S, Parker SM, Wang C, Afentoulis ME, Lewis A, et al. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol.* 2006;176(11):6523–31.

- Ouriques Martins SC, Sacks C, Hacke W, Brainin M, de Assis Figueiredo F, Marques Pontes-Neto O, et al. Priorities to reduce the burden of stroke in Latin American countries. *Lancet Neurol*. 2019;18(7):674-683.
- Pajares M, Cuadrado A, Rojo AI. Modulation of proteostasis by transcription factor NRF2 and impact in neurodegenerative diseases. *Redox Biol*. 2017;11:543-553.
- Palma JA, Benarroch EE. Neural control of the heart: recent concepts and clinical correlations. *Neurology*. 2014;83(3):261–71.
- Patel RAG, McMullen PW. Neuroprotection in the treatment of acute ischemic stroke. *Prog Cardiovasc Dis*. 2017;59(6):542-48.
- Petrea RE, Beiser AS, Seshadri S, Kelly-Hayes M, Kase CS, Wolf PA. Gender differences in stroke incidence and poststroke disability in the Framingham heart study. *Stroke*. 2009;40(4):1032-7.
- Petronilho F, Florentino D, Danielski LG, Vieira LC, Martins MM, Vieira A, et al. Alpha-lipoic acid attenuates oxidative damage in organs after sepsis. *Inflammation*. 2016;39(1):357-365.
- Petronilho F, Vuolo F, Galant LS, Constantino L, Tomasi CD, Giombelli VR, et al. Gastrin-releasing peptide receptor antagonism induces protection from lethal sepsis: involvement of toll-like receptor 4 signaling. *Mol Med*. 2012;18(1):1209-19.
- Pierdominici M, Ortona E, Franconi F, Caprio M, Straface E, Malorni W. Gender specific aspects of cell death in the cardiovascular system. *Curr Pharm Des*. 2011;17(11):1046-55.
- Pineda S, Bang OY, Saver JL, Starkman S, Yun SW, Liebeskind DS, et al. Association of serum bilirubin with ischemic stroke outcomes. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2008;17(3):147-52.
- Pomatto LCD, Tower J, Davies KJA. Sexual dimorphism and aging differentially regulate adaptive homeostasis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018;73(2):141-149.
- Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, et al. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med*. 2003; 198(5):725–36.
- Prass K, Braun JS, Dirnagl U, Meisel C, Meisel A. Stroke propagates bacterial aspiration to pneumonia in a model of cerebral ischemia. *Stroke*. 2006;37(10):2607–12.
- Pronsato L, Milanese L, Vasconsuelo A, La Colla A. Testosterone modulates FoxO3a and p53-related genes to protect C2C12 skeletal muscle cells against apoptosis. *Steroids*. 2017;124:35-45.
- Reddy VP. Oxidative stress in health and disease. *Biomedicines*. 2023;11(11):2925.

Reeves MJ, Bushnell CD, Howard G, Gargano JW, Duncan PW, Lynch G, et al. Sex differences in stroke: epidemiology, clinical presentation, medical care, and outcomes. *Lancet Neurol*. 2008;7(10):915-26.

Rehman S, Sahle BW, Chandra RV, Dwyer M, Thrift AG, Callisaya M, et al. Sex differences in risk factors for aneurysmal subarachnoid haemorrhage: systematic review and meta-analysis. *J Neurol Sci*. 2019;406:116446.

Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Thorpe SR. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11 Suppl 5:48-53.

Rexrode KM, Madsen TE, Yu AYX, Carcel C, Lichtman JH, Miller EC. The impact of sex and gender on stroke. *Circ Res*. 2022;130(4):512-528.

Rocco A, Fam G, Sykora M, Diedler J, Nagel S, Ringleb P. Poststroke infections are an independent risk factor for poor functional outcome after three-months in thrombolysed stroke patients. *Int J Stroke*. 2013;8(8):639-44.

Rodríguez-García A, García-Vicente R, Morales ML, Ortiz-Ruiz A, Martínez-López J, Linares M. Protein carbonylation and lipid peroxidation in hematological malignancies. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(12):1212.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics – 2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125(1):2-220.

Rover Jr L, Hoehr NF, Vellasco AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím Nova*. 2001; 24(1): 112-9.

Roy-O'Reilly M, McCullough LD. Age and Sex Are Critical Factors in Ischemic Stroke Pathology. *Endocrinology*. 2018;159(8):3120-3131.

Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, et al. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44(7):2064-89.

Sahota P, Vahidy F, Nguyen C, Bui TT, Yang B, Parsha K, et al. Changes in spleen size in patients with acute ischemic stroke: a pilot observational study. *Int J Stroke*. 2013;8(2):60–7.

Scheitz JF, Nolte CH, Doehner W, Hachinski V, Endres M. Stroke–heart syndrome: clinical presentation and underlying mechanisms. *Lancet Neurol*. 2018;17(12):1109–20.

Sebastian S, Stein LK, Dhamoon MS. Infection as a Stroke Trigger. *Stroke*. 2019;50(8):2216-2218.

Seifert HA, Hall AA, Chapman CB, Collier LA, Willing AE, Pennypacker KR. A transient decrease in spleen size following stroke corresponds to splenocyte release into systemic circulation. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012;7(4):1017-24.

Seifert HA, Offner H. The splenic response to stroke: from rodents to stroke subjects. *J Neuroinflamm*. 2018;15(1):195.

Sevastos N, Savvas SP, Rafailidis PI, Manesis EK. Cholestasis in acute stroke: an investigation on its prevalence and etiology. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40(7):862-6.

Shami NJE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr*. 2004;17(2):227-36.

Sinagra E, Pellegatta G, Guarnotta V, Maida M, Rossi F, Conoscenti G, et al. Microbiota gut–brain axis in ischemic stroke: a narrative review with a focus about the relationship with inflammatory bowel disease. *Life (Basel)*. 2021; 11(7):715.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801.

Siotto M, Germanotta M, Santoro M, Canali R, Pascali S, Insalaco S, et al. Oxidative stress status in post stroke patients: sex differences. *Healthcare (Basel)*. 2022;10(5):869.

Smith CJ, Denes A, Tyrrell PJ, Di Napoli M. Phase II anti-inflammatory and immunomodulating drugs for acute ischaemic stroke. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015;24(5):623-43.

Strnad P, Tacke F, Koch A, Trautwein C. Liver — guardian, modifier and target of sepsis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;14(1):55–66.

Stuart-Shor EM, Wellenius GA, Dellolacono DM, Mittleman MA. Gender differences in presenting and prodromal stroke symptoms. *Stroke*. 2009;40(4):1121-6.

Tariq MB, Lee J, McCullough LD. Sex differences in the inflammatory response to stroke. *Semin Immunopathol*. 2023;45(3):295-313.

Tenkorang MA, Snyder B, Cunningham RL. Sex-related differences in oxidative stress and neurodegeneration. *Steroids*. 2018;133:21-27.

Teramoto S. Novel preventive and therapeutic strategy for post-stroke pneumonia. *Expert Rev Neurother* (2009);9(8):1187–200.

Tharmalingam S, Alhasawi A, Appanna VP, Lemire J, Appanna VD. Reactive nitrogen species (RNS)-resistant microbes: adaptation and medical implications. *Biol Chem*. 2017;398(11):1193-1208.

- Tiberi J, Cesarini V, Stefanelli R, Canterini S, Fiorenza MT, La Rosa P. Sex differences in antioxidant defence and the regulation of redox homeostasis in physiology and pathology. *Mech Ageing Dev.* 2023;211:111802.
- Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2022 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2022;145(8):153-639.
- Vahidy FS, Parsha KN, Rahbar MH, Lee M, Bui TT, Nguyen C, et al. Acute splenic responses in patients with ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(6):1012–21.
- Vermeij JD, Aslami H, Fluiter K, Roelofs JJ, van den Bergh WM, Juffermans NP, et al. Traumatic brain Injury in rats Induces lung injury and systemic immune suppression. *J Neurotrauma.* 2013;30(24):2073–9.
- Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American Heart Associations. *Circulation.* 2022;141(9):139-596.
- Vyas MV, Silver FL, Austin PC, Yu AXY, Pequeno P, Fang J, et al. Stroke incidence by sex across the lifespan. *Stroke.* 2021;52(2):447-451.
- Welch KD, Davis TZ, Eden MEV, Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(7): 577-83.
- Wen SW, Wong CHY. An unexplored brain-gut microbiota axis in stroke. *Gut Microbes.* 2017;8(6):601–6.
- Whiteley W, Jackson C, Lewis S, Lowe G, Rumley A, Sandercock P, et al. Inflammatory Markers and Poor Outcome After Stroke: A Prospective Cohort Study and Systematic Review of Interleukin-6. *PLoS Med.* 2009;6(9):1000145.
- Whitnall MH. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol.* 1993;40(5):573–629.
- Woodruff TM, Thundyil J, Tang SC, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam TV. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener.* 2011;6(1):11.
- Wu J, Williams D, Walter GA, Thompson WE, Sidell N. Estrogen increases Nrf2 activity through activation of the PI3K pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 2014;328(2):351-60.
- Xiao M, Li Q, Feng H, Zhang L, Chen Y. Neural vascular mechanism for the cerebral blood flow autoregulation after hemorrhagic stroke. *Neural Plast.* 2017;2017:5819514.

Yilmaz G, Granger DN. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. *Neuromolecular Med.* 2010;12(2):193–204.

Yu S, Su Z, Miao J, Yu Y, Zhang S, Wu J, Tian T. Different types of family history of stroke and stroke risk: results based on 655,552 individuals. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.* 2019;28(3):587-94.

Zaid Y, Rajeh A, Hosseini Teshnizi S, Alqarn A, Tarkesh F, Esmailinezhad Z, Nikandish R. Epidemiologic features and risk factors of sepsis in ischemic stroke patients admitted to intensive care: a prospective cohort study. *J Clin Neurosci.* 2019;69:245-249.

Zhang H, Prabhakar P, Sealock R, Faber JE. Wide genetic variation in the native pial collateral circulation is a major determinant of variation in severity of stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2010;30(5):923–94.

Zhao J, Xuan NX, Cui W, Tian BP. Neurogenic pulmonary edema following acute stroke: the progress and perspective. *BioMed Pharmacother.* 2020;130:110478.

Zheng H, Cao N, Yin Y, Feng W. Stroke recovery and rehabilitation in 2016: a year in review of basic science and clinical science. *Stroke Vasc Neurol.* 2017;2(4):222-229.

Zuo L, Shi L, Yan F. The reciprocal interaction of sympathetic nervous system and cAMP-PKA-NF- κ B pathway in immune suppression after experimental stroke. *Neurosci Lett.* 2016;627:205-10.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais**Reitoria
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)**

Palhoça, 02 de agosto de 2022
Registro na CEUA Nº 22.009.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Rafael Mariano de Bitencourt

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Relação entre acidente vascular cerebral isquêmico e infecção sistêmica em ratos wistar sobre o estresse oxidativo em órgãos alvo.", registrada com o nº 22.009.4.01.IV, sob a responsabilidade de Rafael Mariano de Bitencourt - 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 16 de agosto de 2022.

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,

Anna Paula Piovezan
Coordenadora da Comissão