

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE

DIOGO DOMINGUINI

IMPACTO DO ESTRESSE CRÔNICO SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM RATOS
SUBMETIDOS À SEPSIS

CRICIÚMA

2017

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE

DIOGO DOMINGUINI

IMPACTO DO ESTRESSE CRÔNICO SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM RATOS
SUBMETIDOS À SEPSE

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. João Quevedo
Coorientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

CRICIÚMA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

D671i Domingui, Diogo.

Impacto do estresse crônico sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos submetidos à sepse / Diogo Domingui ; orientador : João Quevedo ; Coorientador : Felipe Dal Pizzol. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2017.
88 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

1. Sepse. 2. Estresse crônico moderado. 3. Estresse oxidativo. 4. Avaliação do comportamento. I. Título.

CDD. 22ª ed. 616.944



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

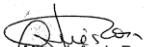
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

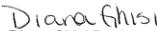
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 274

Com início às 08h30 (oito horas e trinta minutos) do dia seis do mês de março de 2017 (dois mil e dezessete), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Diogo Domingui**, sob a orientação do Prof. Dr. João Luciano de Quevedo, intitulada **"O IMPACTO DO ESTRESSE CRÔNICO SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM RATOS SUBMETIDOS À SEPSE"**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof.^a Dra. Samira da Silva Valvassori (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado; Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof.^a Dra. Cristiane Damiani Tomasi (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – 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 09h30 (nove horas e trinta minutos), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, 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 a Prof.^a Dra. Maria Inês da Rosa Coordenadora do Programa. Criciúma, 06 (seis) de março de 2017 (dois mil e dezessete).


Prof.^a Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora do PPGCS


Diana Ghisi Daniel
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional conforme normas constantes na Resolução n° 07/2015, propostas pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Este trabalho foi realizado nas instalações dos Laboratórios de Neurociências e de Fisiopatologia Experimental, ambos vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

*Aos meus pais, Analice e Jurlei
Dominguini e meu irmão Tiago
Dominguini que não mediram
esforços para ajudar-me em minha
formação acadêmica.*

AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer a todas as pessoas que de algum modo, nos momentos serenos e/ou apreensivos, fizeram ou fazem parte da minha vida, por isso primeiramente agradeço a todos de coração.

Agradeço aos meus avôs maternos Angelo e Nair Paludo e "*in memoriam*" aos meus avôs paternos Narciso e Caetana Domingui, que partiram muito cedo, e hoje não estão mais comigo nesse momento de felicidade. Obrigado, pois cresci e aprendi muito com vocês.

Agradeço aos meus pais, Analice Fátima Paludo Domingui e Jurlei Domingui, pela determinação e luta na minha formação e do meu irmão, fazendo amparar os ensinamentos de meus avôs. Meus pais, pessoas fortes batalhadoras, que sempre lutam buscando o melhor para mim, me ajudando e incentivando. Uma frase que fica sempre na lembrança é “filho estuda, é o que eu e teu pai podemos lhe dar. Nós não tivemos essa chance que estamos te proporcionando, aproveita filho”. Obrigado Pai e Mãe por tudo.

Agradeço ao meu irmão Tiago Domingui, que por mais difíceis que fossem as circunstâncias, sempre esteve comigo, apesar das dificuldades da vida eu sempre estarei ao seu lado, meu irmão.

Agradeço aos amigos e familiares que acompanharam toda a minha trajetória e sempre me apoiaram em suas palavras, mensagens de incentivo e carinho a mim.

Não poderia deixar de agradecer pelo companheirismo, dignidade, carinho, autenticidade e amizade de Débora Borges Tomaz, bem como toda a equipe dos Laboratórios de Neurociências e de Microbiologia da UNESC.

Agradeço aos coordenadores do PPGCS e a todos os professores que compõem o programa, por terem acreditado num sonho que agora se concretiza. Obrigado professores, por terem me mostrado o caminho das obras científicas e por desempenharem com dedicação as aulas ministradas durante esse um ano e meio.

Agradeço a banca avaliadora de meu trabalho, pois tiraram um tempo em suas vidas corridas para me avaliar. Muito obrigado.

Agradeço ao meu orientador, Professor João Quevedo e meu co-orientador, Professor Felipe Dal Pizzol, pelas oportunidades de realizar o mestrado e possível doutorado. Obrigado pela paciência e pelos ensinamentos, são dois grandes homens.

Agradeço a minha amiga Amanda V. Steckert, que com seu jeito me ajudou nesta etapa de minha vida, bem como pelos seus ensinamentos,

me mostrou desde a realização de simples técnicas bioquímicas à elaboração de textos. Obrigado, seus ensinamentos foram valiosos.

Agradeço a todos os funcionários da Universidade que tiveram participação direta e indireta na minha formação. Aos órgãos de fomento (CAPES e UNESC), pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro necessário a execução dos experimentos favorecendo no meu aprendizado.

RESUMO

As respostas inflamatórias e imunológicas evocadas durante a sepse podem criar uma disfunção cerebral aguda e de longo prazo. O estresse crônico moderado (ECM) pode ocasionar a mudanças neuroquímicas e comportamentais, e seus impactos necessitam ser compreendidos, sobretudo na sepse que é uma patologia com alto índice de mortalidade e co-morbidade. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do ECM sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos submetidos à sepse. Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, procedentes do biotério da UNESC. Os animais foram divididos entre os grupos experimentais: controle e ECM e, em seguida, iniciou-se ao protocolo de ECM. Após 40 dias da indução do estresse crônico, os animais foram submetidos ao teste de anedonia (durante sete dias). Ao final do teste, os animais foram submetidos à sepse por CLP e divididos em quatro grupos experimentais: Controle+Sham, Controle+CLP, ECM+Sham, e ECM+CLP. Imediatamente após a indução da sepse foi realizada a avaliação do *sickness behavior* e o controle da mortalidade. Em 10 dias após a sepse, os animais foram submetidos aos testes de habituação ao campo aberto, *splash test* e nado forçado. Em seguida foram retirados o córtex frontal e hipocampo para análise dos níveis de citocinas (IL1 β , IL6 e TNF- α) e de estresse oxidativo (TBARS e carbonilação de proteínas). O grupo ECM apresentou um comportamento anedônico, e após a sepse, foi observada uma maior mortalidade e uma diminuição das atividades locomotora e exploratória nos grupos ECM+CLP e Controle+CLP. Ocorreu uma diminuição de *grooming* no grupo controle+CLP e ECM+sham. Os níveis de TBARS estavam aumentados no córtex frontal, nos grupos Controle+CLP e ECM+CLP e no hipocampo, no grupo ECM+CLP. Também foi observado em córtex frontal o aumento dos níveis das proteínas carboniladas nos grupos Controle+CLP, ECM+Sham e ECM+CLP, e no hipocampo, nos grupos Controle+CLP e ECM+CLP. Os níveis de TNF- α apresentaram um aumento em córtex frontal e hipocampo no grupo Controle+CLP comparados ao grupo Controle+Sham. Os níveis de IL-1 β estavam aumentados no grupo Controle+CLP comparado ao grupo Controle+Sham no hipocampo. Os níveis de IL-6 estavam aumentados no córtex frontal dos animais dos grupos Controle+CLP e ECM+Sham, e no hipocampo no grupo Controle+CLP, comparado ao grupo Controle+Sham. Os dados do presente estudo sugerem que o estresse anterior, causado pela indução da ECM, pode diminuir a inflamação

cerebral e o comportamento depressivo de longo prazo induzido pela sepse grave.

Palavras chaves: cérebro, estresse crônico moderado, sepse, inflamação e estresse oxidativo.

ABSTRACT

The inflammatory and immune responses evoked during sepsis can create acute and long-term brain dysfunction. Chronic mild stress (ECM) can lead to neurochemical and behavioral changes, and their impacts need to be understood, especially in sepsis, which is a pathology with a high mortality rate and co-morbidity. The objective of this study is to evaluate the impact of chronic stress on behavioral and biochemical behavior in rats submitted to sepsis. Rats were used, adults and coming from the laboratory of UNESC. The animals were divided between the experimental groups: control and ECM, and then the ECM protocol was started. After 40 days of chronic stress study, the animals were submitted to the anhedonia test (for seven days). At the end of the test, the animals were submitted to sepsis by CLP and divided into four experimental groups: Control + Sham, Control + CLP, ECM + Sham, and ECM + CLP. Immediately after induction of sepsis, the evaluation of sickness behavior and the control of mortality were performed. In 10 days after sepsis, the animals were submitted to the tests of open field, splash test and forced swimming. The frontal cortex and hippocampus were then removed for analysis of cytokine levels (IL1 β , IL6 and TNF- α) and oxidative damage (carbonyl and TBARS). The CMS group presented an anecdotal behavior, and after sepsis, a higher mortality and a decrease in locomotor and exploratory activity were observed in the CMS+CLP and Control+CLP groups. There was a decrease in grooming in the control+CLP and CMS+sham groups. The levels of TBARS were increased in the frontal cortex in the Control+CLP and CMS+CLP groups and in the hippocampus in the CMS+CLP group. The levels of carbonyl proteins in the Control + CLP, CMS+Sham and CMS+CLP groups, and in the hippocampus, Control+CLP and CMS+CLP groups were also observed in the frontal cortex. TNF- α levels had an increase in frontal cortex and hippocampus in the Control+CLP group compared to the Control+Sham group. IL-1 β levels were increased in the Control+CLP group compared to the Control+Sham group in the hippocampus. IL-6 levels were increased in the frontal cortex of the Control+CLP and CMS+Sham groups, and in the hippocampus in the Control+CLP group compared to the Control+Sham. The data from the present study suggest that an earlier stress caused by CMS induction may decrease brain inflammation and the long-term depressive behavior induced by severe sepsis.

Keywords: brain, chronic mild stress, sepsis, inflammation, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema simplificado do comprometimento do SNC na sepse.	27
Figura 2 - Mecanismo da liberação de glicocorticóides.	30
Figura 3 - Representação do envolvimento da inflamação com o SB e a depressão.	33
Figura 4 - Aparato utilizado para a realização do teste de anedonia. ...	40
Figura 5 - Protocolo para a avaliação do SB e avaliação da mortalidade.	42
Figura 6 - Movimentos de <i>grooming</i>	43
Figura 7 - Representação gráfica do resultado do teste comportamental anedonia.	47
Figura 8 - Representação gráfica da curva de sobrevivência.	48
Figura 9 - Representação gráfica do teste de SB.	49
Figura 10 - Representação gráfica do resultado do teste comportamental de atividade locomotora e exploratória.	50
Figura 11 - Representação gráfica do resultado do teste comportamental <i>splash test</i>	51
Figura 12 - Representação gráfica do resultado do teste comportamental de nado forçado.	51
Figura 13 - Representação gráfica dos resultados do teste TBARS.	52
Figura 14 - Representação gráfica do resultado do teste de carbonilação de proteínas.	53
Figura 15 - Representação gráfica dos níveis de TNF- α	54
Figura 16 - Representação gráfica dos níveis de IL-1 β	55
Figura 17 - Representação gráfica dos níveis de IL-6.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH – Hormônio adenocorticotrópico
ANOVA - Análise de variância
BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)
BHE – Barreira hematoencefálica
BSA – Albumina bovina sérica (do inglês *bovine serum albumin*)
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CLP – Ligação e perfuração cecal (do inglês *cecal ligation puncture*)
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRH – Hormônio Liberador da Corticotrofina
DFX – Desferroxamina
DNPH – Dinitrofenilidrazina (do inglês *dinitrophenylhydrazine*)
EAS – Encefalopatia associada a sepse
ECM – Estresse crônico moderado
ELISA - Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (do inglês, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
ERO – Espécies reativas de oxigênio
GABA - Ácido gama-aminobutírico
HPA – Eixo hipotálamo-pituitário-adrenal
IL-1 β – Interleucina-1 beta
IL-6 – Interleucina 6
LPS – Lipopolissacarídeo
MDA – Malondialdeído
MS - Ministério da Saúde
NAC – N-acetilcisteína
NF- κ B – Fator nuclear kappa B (do inglês *nuclear factor kappa B*)
NO – Óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)
PAMP – Padrão molecular associado ao patógeno (do inglês *pathogen associated molecular patterns*)
PBS – Tampão fosfato salina (do inglês *phosphate buffered saline*)
PPRs – Receptores de reconhecimento padrão
SB - Comportamento doentio (do inglês *sickness behavior*)
SNA – Sistema nervoso autônomo
SNC – Sistema nervoso central
SPSS – do inglês *Statistical Package for the Social Science*
TBA - Ácido tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances*)
TCA – Ácido tricloroacético

Th1 - Células T do tipo 1 (do inglês *T helper tipo 1 Cells*)

Th2 – Células T do tipo 2 (do inglês *T helper tipo 2 Cells*)

TLR – Receptor *Toll-Like* (do inglês *Toll-Like receptors*)

TNF- α – Fator de necrose tumoral (do inglês *tumoral necrosis fator alpha*)

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 SEPSE	23
1.1.1 Fisiopatologia da sepse	24
1.1.2 Sepse e o sistema nervoso central	26
1.2 ESTRESSE CRÔNICO MODERADO	29
1.3 <i>SICKNESS BEHAVIOR</i>	32
1.4 MODELO ANIMAL DE SEPSE	33
1.5 JUSTIFICATIVA	34
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	37
3.2 TAMANHO AMOSTRAL	37
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	38
3.3.1 Protocolo de ECM	38
3.3.2 Teste da ingestão de alimento doce	39
3.4 MODELO ANIMAL DE SEPSE	40
3.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	41
3.5.1 Sickness behavior e controle da mortalidade	41
3.5.2 Splash test	42
3.5.3 Atividade locomotora exploratória	43
3.5.4 Nado forçado	43
3.6 REMOÇÃO DAS ESTRUTURAS	44
3.7 AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO	44
3.7.1 Mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	44
3.7.2 Mensuração dos grupamentos carbonila	45
3.8 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE CITOCINAS	45
3.9 MENSURAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS	46
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4 RESULTADOS	47
4.1 CONSUMO DE SACAROSE	47

4.2 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA	47
4.3 <i>SICKNESS BEHAVIOR</i>	48
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA	50
4.5 <i>SPLASH TEST</i>	50
4.6 TESTE DE NADO FORÇADO.....	51
4.7 AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO.....	52
4.8 AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CITOCINA	53
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	68
APÊNDICE.....	82
APÊNDICE A – DESENHO EXPERIMENTAL	83
APÊNDICE B – PROTOCOLO PARA A INDUÇÃO DO ECM	84
ANEXO	85
ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	86
ANEXO B – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE

Uma das maiores causas de morte em unidade de terapia intensiva (UTI) é a sepse. A sepse pode ser caracterizada como uma alteração na resposta inflamatória que atinge todos os sistemas do corpo (Angus e Wax, 2001; Sales et al., 2006; Oviedo-Boyso et al., 2014). Essa alteração na resposta inflamatória pode ser classificada conforme sua magnitude como: sepse, sepse grave e choque séptico, os quais representam estágios cada vez mais graves dessa resposta inflamatória (Singer et al., 2004; Rudiger et al., 2008).

Recentemente novas definições de sepse foram construídas, caracterizando-a como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção; e o choque séptico como uma alteração na hemodinâmica, celular e/ou metabólica (Singer et al., 2016). A sepse é voltada a presença clínica de infecção, envolvendo a ativação precoce da resposta pró e antiinflamatória, junto com modificações nos sistemas cardiovascular, neuronal, autônomo, hormonal, bioenergéticas, metabólicas e de coagulação (How et al., 2011; Angus e Van der Poll, 2013; Deutschman e Tracey, 2014).

Esse processo inflamatório pode ser causado por patógenos - bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e vírus, que ao invadirem um tecido levam a danos teciduais e podem conduzir à falência orgânica. Essa invasão, por sua vez, leva a uma descontrolada resposta do sistema imune, tendo como característica uma ampliação rápida dos sinais inflamatórios. (Vincent, 2000; Takala et al., 2002).

O tratamento para a sepse é inespecífico, limitado ao apoio da função do órgão e administração de fluidos intravenosos, antibióticos e oxigênio (Derek et al., 2013). Ainda não existem medicamentos aprovados que visam especificamente a sepse, por isso há necessidade de buscar novas abordagens terapêuticas eficazes para esta doença (Deutschman e Tracey, 2014).

A incidência da sepse está aumentando e fatores como: sexo, raça, idade, comorbidade, ambiente e a carga genética, podem influenciar no desenvolvimento da doença, bem como em sua progressão (Singer et al., 2016). O envelhecimento também pode ser apontado como um fator que influencia no curso clínico da doença, conforme os estudo de Iwashyna e colaboradores (2012).

Nos Estados Unidos, o número de casos de sepse ultrapassa 750.000 casos por ano, sendo o diagnóstico registrado em 2% dos pacientes internados em unidades hospitalares. No entanto, desses 2%, 50% são tratados em UTIs (Derek et al., 2013). Um estudo realizado por Sales e colaboradores (2006) em 75 UTIs de todas as regiões do Brasil, observou que de 3128 pacientes, 521 (16,7%) apresentaram algum estágio de alteração na resposta inflamatória. Ainda segundo este estudo, a taxa de mortalidade na sepse, sepse grave e choque séptico foram de 16,7%, 34,4% e 65,3%, respectivamente.

Conforme dados do Ministério da Saúde, através do sistema de informação hospitalar no DATASUS, no período de 2014, no item taxa mortalidade hospitalar por septicemia, foi de 44,53% no Brasil; 35,83% no estado de Santa Catarina; e 53,51% na região sul do estado de Santa Catarina. Além disso, Silva e colaboradores (2004) investigaram cinco hospitais de dois estados brasileiros (Santa Catarina e São Paulo) e demonstraram que a sepse apresenta uma alta taxa de incidência, e é considerada um grave problema de saúde pública.

1.1.1 Fisiopatologia da sepse

A sepse é um processo inflamatório onde há uma resposta tecidual à agressão do agente invasor. Seu desencadeamento depende das relações estabelecidas entre os microrganismos e o hospedeiro, para que haja uma ativação exacerbada da resposta imune inata, causada pelo reconhecimento de um patógeno (Maxime et al., 2007; Hennessy et al., 2014; Oviedo-Boyso et al., 2014). A interação entre microrganismo e hospedeiro se inicia pelo reconhecimento das substâncias do agente etiológico, que em níveis celulares, acontece pelos receptores de reconhecimento padrão (PPRs). Sendo os mais comuns os receptores Toll-Like (TLR), os quais são expressos por células do sistema imune inato (Hubacek et al., 2001; Hennessy et al., 2014).

Os TLR são uma família de proteínas transmembranas do tipo I, com a responsabilidade de identificar os padrões de reconhecimento de patógenos (PAMPs) expressados por um amplo espectro de agentes infecciosos (Ducottet et al., 2003). As diferentes localizações subcelulares de PPRs e a ampla variedade de PAMPs permitem que o hospedeiro possa identificar agentes patogênicos lesivos. Após o reconhecimento, vias de transdução de sinal são ativadas, que culminam com a translocação do fator nuclear *Kappa* B (NF- κ B) para o núcleo celular. Este, por sua vez, regula a resposta inflamatória através da expressão de mediadores pró-inflamatórios, como o óxido nítrico (NO),

interleucina 1- β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Oviedo-Boyso et al., 2014). Com a liberação de mediadores inflamatórios e das proteínas do patógeno pode ocorrer a ativação do sistema de coagulação. Levando a hipoperfusão e hipóxia tecidual, com conseqüente disfunção de órgãos (Abbas et al., 1996; Hubacek et al., 2001; Abraham et al., 2007).

O TNF- α e a IL-1 β ativam a resposta imune adaptativa, que é responsável pela amplificação da imunidade inata. Com o aumento dessas citocinas, há uma ativação das células B, que liberam imunoglobulinas facilitadoras da apresentação de antígenos para as células fagocitárias. Além disso, as células T do tipo 1 (Th1) podem secretar citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-1 β , auxiliando no aumento das moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais; e aumento da permeabilidade vascular, ocasionando edema tecidual (Mina et al., 2013).

Na resposta inflamatória, outro componente importante é o óxido nítrico, um potente vasodilatador, que no choque séptico tem um papel crucial nas alterações hemodinâmicas (Oviedo-Boyso et al., 2014). Também há a liberação de outras interleucinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-11 e IL-13) MCP-1, prostaglandinas e formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que auxiliam na resposta inflamatória e no combate ao agente invasor (Mina et al., 2013).

Com a ativação dos monócitos e macrófagos, há um aumento da síntese de citocinas, como a IL-6, que pode levar à produção de proteínas de fase aguda, como a proteína-C reativa e a albumina (Oviedo-Boyso et al., 2014). Essa resposta ativa os sistemas de coagulação sanguínea e dá início as disfunções celulares e dos órgãos (Abbas et al., 1996; Hubacek et al., 2001).

Durante a sepse ocorrem alterações do metabolismo celular, que afetam lipídios, carboidratos e proteínas. Essas alterações podem culminar em dano oxidativo, ou ainda ativar vias que levam a apoptose (Abraham et al., 2007). A diminuição de oxigênio aos tecidos pode ser em decorrência da queda do fluxo sanguíneo e a redução do débito cardíaco. Contribuindo assim, para o aumento do metabolismo anaeróbico e a hiperlactatemia, levando a alterações na fisiologia celular (Abbas et al., 1996; Hubacek et al., 2001; Hennessy et al., 2014).

Dessa forma, quando existe um desequilíbrio entre a geração de ERO e as defesas antioxidantes, ocasionando um potencial dano oxidativo que por sua vez pode desencadear a lipoperoxidação, formando produtos secundários, incluindo o malondialdeído (MDA) ocasionando modificações na fluidez e na permeabilidade das membranas celulares

(Dalle-Donne et al., 2006). Por outro lado, a oxidação direta de proteínas por ERO produz derivados carbonilados altamente reativos, resultando na oxidação das cadeias laterais de aminoácidos resultando na formação de carbonilas, tióis oxidados, entre outras modificações que alteram a função normal da proteína (Dalle-Donne et al., 2006; Bozza et al., 2013).

O sistema imunológico tenta manter uma regulação entre o equilíbrio pró e antiinflamatório. Porém, é um mecanismo complexo, em que há o envolvimento de monócitos/macrófagos como ativadores da resposta imune adaptativa. Como já citado anteriormente, os linfócitos podem assumir um fenótipo Th1, o que leva a liberações de substâncias pró-inflamatórias, ou podem assumir o fenótipo Th2, que leva à produção de IL-4 e IL-10, as quais reduzem a resposta pró-inflamatória. Na sepse ocorre um desequilíbrio entre essa regulação (pró e antiinflamatória) causando um descontrole nesse processo (Mina et al., 2013). O cérebro também é sensível à presença dos microorganismos, e a essas alterações celulares, através de diferentes mecanismos (Papadopoulos et al., 2000; Comin, et al., 2011; Steckert, et al., 2013).

1.1.2 Sepse e o sistema nervoso central

Na sepse, o sistema nervoso central (SNC) é afetado, gerando respostas como hipertermia ou a hipotermia, falta de apetite, ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e *delirium* (Licinio e Wong, 1997; Dinarello, 2004). Podem ser observados vários graus de alterações dos níveis de consciência nos pacientes sépticos, variando desde um estado de comprometimento leve até o coma (Tomasi et al., 2016). As principais manifestações clínicas do envolvimento do SNC que aparecem são a encefalopatia associada à sepse (EAS) e a polineuropatia, ocorrendo em 70% dos pacientes sépticos (Young et al, 1990; Bolton, 1996; Dinarello, 2004).

Ainda não está elucidado o completo mecanismo da EAS. Estudos apontam que os fatores que influenciam nessa patologia seriam a redução do fluxo sanguíneo, alteração da barreira hematoencefálica (BHE), formação de edema cerebral, produção de mediadores inflamatórios, disfunção de neurotransmissores e mitocondrial (Licinio e Wong, 1997; Papadoulos et al., 2000; Dinarello, 2004; Bozza et al., 2010).

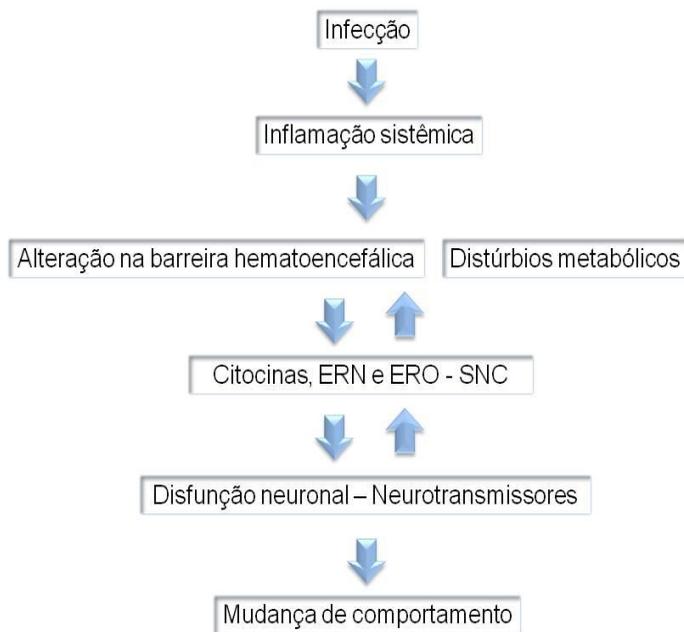


Figura 1 - Esquema simplificado do comprometimento do SNC na sepsis. A resposta inflamatória exacerbada leva a distúrbios metabólicos e alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica, permitindo a passagem de mediadores inflamatórios para o SNC, levando à ativação da microglia e disfunção neuronal. Essas disfunções neuronais podem acarretar, em longo prazo, alteração funcional e cognitiva em pacientes e em modelos animais. **Fonte:** Adaptado de Jacob e colaboradores (2011).

A sepsis afeta a BHE, que regula a homeostase no SNC. Uns dos componentes da BHE são as metaloproteínas, que neste processo inflamatório, estão desreguladas, permitindo que circulem substâncias neurotóxicas para o parênquima cerebral e, conseqüentemente, a infiltração de leucócitos e a ativação da microglia (Dal-Pizzol et al., 2013). A passagem dessas endotoxinas pode induzir alterações nas funções fisiológicas afetando a homeostasia, levando a EAS (Cauvi et al., 2012; Dal-Pizzol et al., 2013). Essas disfunções afetam as células endoteliais, astrócitos e neurônios, tendo envolvimento na ativação de vias apoptóticas, levando a morte neuronal (Messaris et al., 2004).

Estudos demonstraram que na sepse ocorre o aumento de mediadores inflamatórios no SNC capazes de alterar o metabolismo celular. Esses mediadores podem induzir estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, com consequentes alterações na neurotransmissão (Messaris et al., 2004; Comim et al., 2007, 2008, 2011). Em um modelo animal de sepse induzido por ligação e perfuração cecal (CLP) há uma elevação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e a IL-6, no SNC em tempos iniciais da doença. Este aumento de citocinas pode acarretar uma disfunção cerebral, que posteriormente, leva a alterações cognitivas (Comim et al., 2011). Danos oxidativos em proteínas e lipídios e alterações no mecanismo antioxidante também foram observados no tecido cerebral (hipocampo e córtex) entre 0 e 96 horas após a indução da sepse por CLP (Barichello et al 2006). Porém, em um estudo de Barichello e colaboradores (2007), esses danos foram revertidos com o uso de n-acetilcisteína (NAC) e desferoxamina (DFX) em conjunto.

Steckert e colaboradores (2013) mostraram que em animais sépticos houve um aumento nos níveis de IL-6 (após 30 dias da sepse) e de TNF- α (após 60 dias da sepse). Neste mesmo estudo, foi demonstrado que tanto em 30 quanto em 60 dias após a sepse, os níveis de carbonilação de proteína estavam aumentados no estriado. Também foi observado um déficit na memória aversiva em 10 dias após a sepse. Outros estudos também mostraram que ratos sobreviventes a sepse apresentaram dano cognitivo em 10 e 30 dias após a indução por CLP (Barichello et al, 2005, 2007; Comim et al., 2007, 2008, 2011).

Além dos modelos animais, estudos descrevem que pacientes sobreviventes a esta alteração da resposta inflamatória apresentam incapacidade cognitiva em longo prazo, incluindo alterações na memória, atenção, na concentração e/ou na perda global da função cognitiva (Gordon et al, 2004; Hopkins et al, 2005; Jackson et al, 2004; Tomasi et al., 2016). Hopkins e colaboradores (2005) demonstraram que mesmo após a alta hospitalar, esses pacientes podem permanecer com déficits cognitivos. Sharkar e colaboradores (2004 e 2007) em seu estudo *post mortem* com neuroimagem observaram que pacientes sépticos apresentam alterações cerebrais, como lesões isquêmicas, hemorragias e microabscessos.

Recentemente, Singer e colaboradores (2016) mostraram que pacientes sobreviventes a sepse muitas vezes têm deficiências físicas, psicológicas e cognitivas de longo prazo, necessitando, assim, de cuidados de saúde, implicando no contexto social. Além disso, pacientes de UTI sobreviventes a sepse podem apresentar transtornos

psiquiátricos, como quadros de estresse, ansiedade e depressão (Dowing and Miyan, 2000; Dhabhar, 2001; Scragg et al, 2001).

1.2 ESTRESSE CRÔNICO MODERADO

O estresse crônico moderado (ECM) é um conjunto de reações do organismo a agressões de ordem física, psíquica, infecciosa, capazes de perturbar a homeostasia do corpo (Maxime et al, 2007). O estresse vem de um processo fisiológico e adaptativo, entretanto, quando o indivíduo não tem uma boa adaptação, ele surge com uma resposta patológica, levando a distúrbios transitórios ou a doenças graves (Bagot et al., 2014).

Em cada ano, casos novos de estresse aumentam 1%, colocando essa patologia em um grupo de doenças chamadas de "doença do século", remetendo a um grave problema de saúde pública. O estresse atinge milhões de pessoas em todo o mundo, podendo estar relacionado à dinâmica do mundo moderno, decorrente das condições de vida e do estilo de vida (Maxime et al, 2007; Bagot et al., 2014). Sugere-se que uma mudança ocorrida na vida do indivíduo possa ser um efetivo agente estressor (Andel et al., 2011). São elevados os custos sociais, emocionais e psicológicos ligados ao estresse, sendo este, atualmente, o responsável pela queda da produtividade e da alta taxa de ausência ao trabalho (Mcewen et al., 2000; Davidson et al., 2011).

O estresse pode desencadear uma série de doenças como úlceras, infarto do miocárdio, hipertensão, acidente vascular cerebral e o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como a depressão bem como alterações na cognição (de curto ou longo prazo) (Fonseca et al., 2009; Melinder et al., 2015).

O pesquisador Hans Selye foi o primeiro a descrever a fisiopatologia do estresse, no ano de 1936. Ele observou que a percepção de um perigo eminente ou de um evento traumático é realizada pelo córtex, que posteriormente aciona o sistema límbico, que vai induzir alterações na parte emocional e no controle de alguns órgãos (Vollmayr e Henn, 2005; Maxime et al, 2007). O estímulo em estruturas cerebrais como a amígdala e o hipotálamo, pode causar dilatação pupilar, palidez, aceleração e aumento da força cardíaca e da respiração, além de outros sintomas gerados pelo sistema nervoso autônomo (SNA). O hipotálamo tem um papel crucial na ativação da glândula hipófise fazendo aumentar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Bagot et al., 2014).

Esse hormônio, por sua vez, ao chegar nas glândulas adrenais, provoca a liberação de corticosteróides e, conseqüentemente, um aumento de sua disponibilidade na corrente sanguínea (Figura 3). Os corticosteróides possuem ações em muitos tecidos, alterando o metabolismo, a síntese de proteínas, e a resposta inflamatória (Maxime et al,2007).

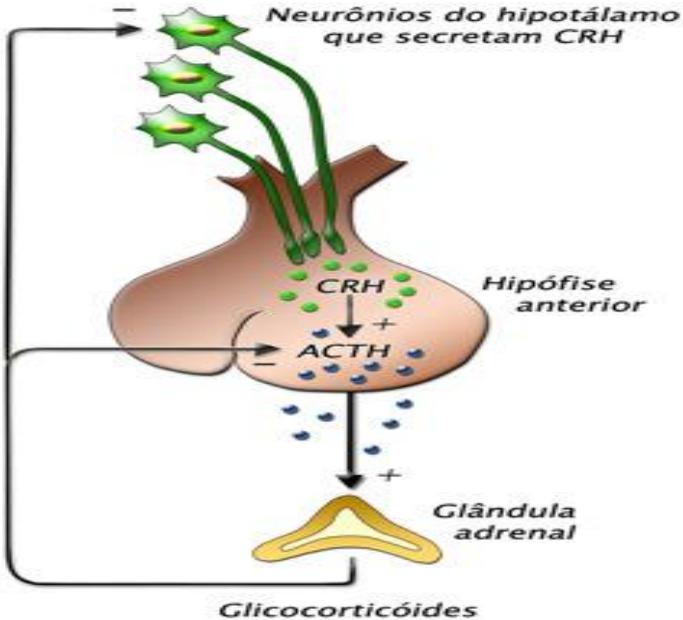


Figura 2 - Mecanismo da liberação de glicocorticóides. Ilustração demonstrando o eixo HPA, elucidado a liberação de glicocorticóides na corrente sanguínea, através da estimulação neuronal (hormônio liberador de corticotrofina - CRH) e da liberação do hormônio ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) pela glândula hipófise. O aumento dos níveis sanguíneos dos glicocorticóides leva a inibição dos neurônios e da hipófise, diminuindo assim a quantidade de ACTH e de glicocorticóides secretados na corrente sanguínea. **Fonte:** www.inec-usp.org/cursos/cursoIII/figuraV.jpg.

Os corticosteróides vêm sendo associados com o processo inflamatório, principalmente através da modulação da resposta imune frente a uma lesão, pois eles podem interagir com os fatores de transcrição como cfos, c-jun e NF-kB, que regulam positivamente a atividade transcricional, desencadeando proteínas com efeitos antiinflamatórias e imunossupressoras (Vollmayr e Henn, 2005; Dantzer et al., 2008; Andel et al., 2011; Kortgen et al., 2014).

A ativação do eixo HPA de forma crônica leva ao desenvolvimento de quadros de ECM (Nestler et al., 2002). O ECM desempenha um papel importante nos distúrbios psiquiátricos por induzir mudanças na expressão gênica, função do circuito neural e comportamental (Bagot et al., 2014).

O impacto do ECM depende do tipo do estressor ao qual o indivíduo é exposto. Katz e colaboradores (1981) mostraram que animais estressados possuem uma pequena redução da ingestão de soluções doces. Em 1987, Willner expos ratos a estressores ambientais (restrição de água e comida, alteração da temperatura ambiental, iluminação contínua, inclinação da gaiola-casa) e observou uma menor resposta dos animais à solução de sacarose (Willner, 2005).

A exposição a fatores estressantes aumenta os níveis de TNF- α , que pode se tornar crônico em casos de ECM, levando ao desenvolvimento de comportamentos do tipo depressivo e uma piora no desempenho cognitivo (Li et al., 2008; Bian et al., 2012). Neste contexto, a exposição dos animais ao ECM leva alterações no eixo HPA, induzindo quadros de anedonia, hipertrofia da glândula adrenal e o aumento dos níveis de corticosterona (Vollmayr e Henn, 2003; Maxime et al., 2007; Garcia et al., 2009). Essas alterações no eixo HPA podem ativar e modificar a resposta adaptativa aos estímulos, ou seja, o animal habitua-se ao estressor, porém quando empregado um estímulo novo, leva à sensibilização do eixo, aumentando a sua resposta (Weiberg et al., 2009).

Testes com antidepressivos em modelos animais de ECM revertem o comportamento apresentado por esses animais. Levando a consolidação da teoria que o ECM é uma das principais causas de depressão (Willner, 2005; Davidson, 2011). De fato, cerca de 60 % dos casos de depressão são desencadeados e precedidos por eventos estressantes relacionados com os fatores psicológicos (Klauke et al., 2010; Davidson, 2011).

Em animais, a exposição ao ECM leva a comportamento semelhante a quadros depressivo observado em humanos. Como a diminuição da atividade exploratória e locomotora, déficits na memória espacial, diminuição do peso corporal bem como diminuição na liberação basal de dopamina e redução na expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Gamero et al., 2003; Garcia et al., 2009; Weiberg et al., 2009; Bian et al., 2012; Borges et al., 2013). Em pacientes depressivos foram observadas hiperatividade do eixo HPA e níveis aumentados de glicocorticóides (Parker et al., 2003).

Em geral, o estresse agudo não traz consequências deletérias para o indivíduo. Porém, no ECM, há ativação de outros componentes

neuroendócrinos, que podem estar envolvidos na gênese de transtornos, alterações comportamentais (déficit de memória), desenvolvimento de quadros de ansiedade e depressão (Gamaro et al., 2003; Vollmayr e Henn, 2005; Garcia et al., 2009; Davidson, 2011; Bian et al, 2012; Bagot et al., 2014).

1.3 *SICKNESS BEHAVIOR*

O *sickness behavior* (SB) é a avaliação do comportamento doentio, referindo-se às mudanças comportamentais desenvolvidas em indivíduos doentes, após a infecção e a lesão tecidual (Dantzer, 2009; Tracey, 2010; Hennessy et al, 2014). As características mais comuns são a diminuição da ingestão de alimentos e água, diminuição da taxa de atividade locomotora, depressão, anedonia, febre e entre outros (Tracey, 2010; Sah et al., 2011).

Na inflamação há o aumento de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Essas citocinas podem mediar os sinais clínicos da resposta do hospedeiro à infecção e desencadear um bloqueio e um prejuízo na atividade neurocognitiva, induzindo ao SB (Burton et al., 2011; Maes et al, 2011). Estudos de Lawson e colaboradores (2013) e de Szentirmai e Krueger (2014) utilizando modelos animais de sepse induzidos por lipopolissacarídeo (LPS) periféricamente e no SNC, mostraram um aumento da temperatura corporal, perda de apetite, diminuição da atividade locomotora e comportamento anedônico.

Dantzer e colaboradores (2008; 2011) mostraram que a IL-1 β é uma citocina importante para a indução do SB, pois, quando administrada periféricamente ou no ventrículo lateral cerebral induz a uma reação de fase aguda, incluindo a febre, a ativação do eixo HPA e comportamento do tipo depressivo. Entretanto, quando administrada a IL-6, foram observadas atividades pirogênicas e corticotróficas, porém não apresentou nenhuma influência na atividade comportamental dos animais. Contudo, quando administradas as duas citocinas em conjunto foi demonstrado que a IL-6 potencializa os efeitos no SB causados pela administração de IL-1 β , tanto periféricamente quanto no SNC. Em outro estudo de Dantzer e colaboradores (2008) utilizando um antagonista dos receptores de IL-1 β no SNC, foi demonstrada uma reversão dos sintomas comportamentais, sugerindo, assim, que esses sintomas são mediados pelos receptores de IL-1 no SNC.

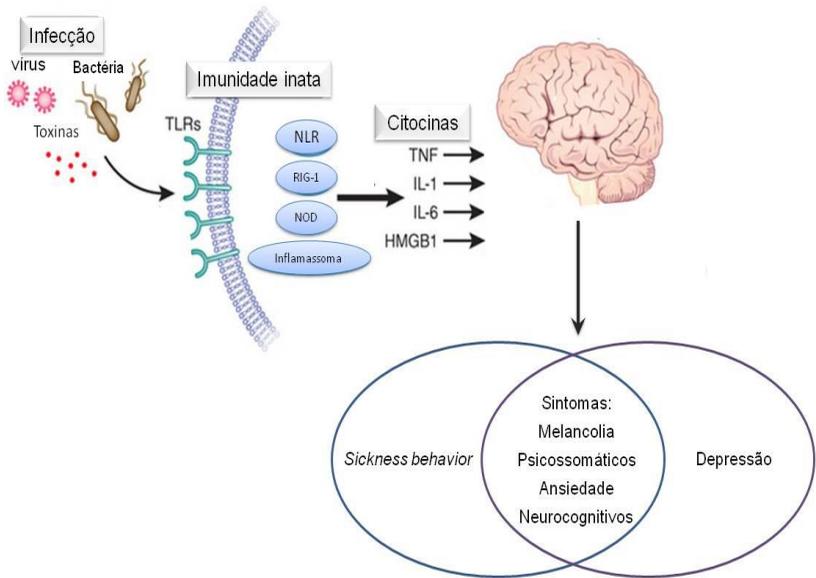


Figura 3 - Representação do envolvimento da inflamação com o SB e a depressão. A imagem ilustra a ativação dos TRL na presença de uma infecção, o que leva a produção e liberação de componentes inflamatórios como, por exemplo, as citocinas, que no SNC, pode levar ao desencadeamento do SB, que apresenta sintomas psicossomáticos, neurocognitivos, melancólicos e ansiosos. Esses sintomas são caracterizados SB, no entanto, também fazem parte dos sintomas de quadros depressivos **Fonte:** Adaptado de Tracey, 2010.

A depressão pode ser oriunda de um ECM ou por uma doença neurodegenerativa (Dowlati et al., 2010; Dantzer et al., 2011). No entanto, estudos trazem semelhanças nos parâmetros comportamentais e inflamatórios entre a depressão e o SB (Li et al., 2008; Yirmiya et al., 2011; Liu et al., 2014). Por outro lado, a ativação crônica do sistema imune inato pode predispor ao desenvolvimento de transtornos depressivos (Dantzer et al., 2008; Dowlati et al., 2010).

1.4 MODELO ANIMAL DE SEPSE

Um dos métodos mais comuns para indução de sepse é o modelo de ligação e perfuração cecal, o chamado CLP. Comim e colaboradores (2007, 2008, 2011) e Steckert e colaboradores (2013) demonstraram que

animais sépticos induzidos por tal modelo apresentam déficit cognitivo, com alteração nas memórias aversiva, de reconhecimento e de habituação e alterações na aquisição de memória. Na tentativa de justificar o dano cognitivo apresentado por esses modelos animais, estudos demonstraram um aumento de dano oxidativo e uma diminuição na atividade antioxidante em tecido cerebral após a indução do método CLP (Barichello et al., 2006; Barichello et al., 2007; Biff et al., 2013).

Estudos de Semmler e colaboradores (2008) e de d'Avila e colaboradores (2008) demonstraram que durante este processo inflamatório, os animais apresentaram alterações no metabolismo energético cerebral, associadas com algumas doenças neurodegenerativas e morte neuronal. Em suma, os modelos animais permitem uma análise das interações moleculares e celulares, bem como um estudo detalhado do comportamento animal, ajudando na elucidação da fisiopatologia da sepse e, futuramente, no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

1.5 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a sepse apresenta altas taxas de mortalidade e morbidade e especula-se que o ECM possa ter impactos sobre os parâmetros bioquímicos e comportamentais. Dessa forma, se faz necessário um estudo detalhado sobre o envolvimento do estresse crônico moderado com o processo inflamatório, dano oxidativo e as alterações comportamentais, o que poderá fornecer informações relevantes para a elucidação de tal impacto na sepse.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto do estresse crônico moderado sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos submetidos à sepse pelo modelo de CLP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento anedônico em ratos Wistar submetidos ao protocolo de estresse crônico (40 dias).
- Avaliar a mortalidade e o sickness behavior (ingestão de comida, água e peso) em ratos Wistar submetidos ao protocolo de estresse crônico (40 dias) e durante 10 dias após a indução de sepse por CLP.
- Avaliar a atividade locomotora e exploratória através do teste de habituação de campo aberto, em ratos Wistar submetidos ao protocolo de estresse crônico (40 dias) e 10 dias após a indução de sepse por CLP.
- Avaliar o comportamento do tipo depressivo através dos testes de nado forçado e splash test em ratos Wistar submetidos ao protocolo de estresse crônico (40 dias) e 10 dias após a indução de sepse por CLP.
- Avaliar os níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em córtex frontal e hipocampo de ratos Wistar submetidos ao protocolo de estresse crônico (40 dias) e 10 dias após a indução de sepse por CLP.
- Avaliar os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de formação de proteína carbonila em córtex frontal e hipocampo de ratos Wistar submetidos ao protocolo de estresse crônico (40 dias) e 10 dias após a indução de sepse por CLP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi realizado dentro das diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (Protocolo 001/2015-1 (anexo A) e protocolo 49/2016-02 (anexo B)). Todos os cuidados foram adotados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos.

3.2 TAMANHO AMOSTRAL

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos (60 dias), com peso variando entre 250 a 350g, procedentes do biotério da UNESC. Os animais foram acondicionados em caixas com 5 animais, em um ciclo de claro e escuro de 12 horas (07:00 às 19:00) com comida e água *ad libitum* (exceto para os dias de privação de água e comida referentes ao protocolo de ECM), mantidos em ambiente com temperatura entre 18 e 22° C e umidade relativa entre 55 e 65%. Os procedimentos cirúrgicos foram sempre realizados no período da manhã, com início às 8h.

Foram utilizados um total de 100 animais para este estudo (Tabela 1), distribuídos em quatro grupos experimentais: Controle+Sham; Controle+CLP; ECM+Sham e ECM+CLP. Estudos anteriores de Papadopoulos e colaboradores (2000) mostram que o n necessário por condição experimental é n= 15. Mas, levando em conta que o índice de mortalidade da sepse é de 20%, e para conseguir um tamanho amostral significativo, mesmo com a eventual perda de animal durante a execução dos experimentos, justifica-se o tamanho amostral em questão.

Tabela 1 – Divisão do número de animais por grupos experimentais.

Grupos experimentais		n + 20% de mortalidade
Controle	Sham	20 Animais
	CLP	30 Animais
ECM	Sham	20 Animais
	CLP	30 Animais
Total de animais	-	100 Animais

Fonte: Dados do autor, 2017.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Inicialmente, os animais foram divididos em dois grupos experimentais: controle e ECM. Logo após, começou a ser aplicado o protocolo de ECM durante 40 dias (apêndice A), em que o grupo ECM esteve exposto a variados estressores. No final do protocolo, os animais foram submetidos ao teste de ingestão de alimento doce (durante sete dias), para avaliação do comportamento anedônico e confirmação da indução do estresse.

Logo após, os animais foram submetidos à sepse pelo método CLP e divididos em quatro grupos experimentais: Controle+Sham (n= 20); Controle+CLP (n=30); ECM+Sham (n=20); e ECM+CLP (n=30). Imediatamente após a indução da sepse iniciou-se a avaliação do SB (controle da ingestão de água, comida e peso corporal) e o controle da mortalidade. Essa avaliação teve duração de 8 dias.

Após 10 dias da indução da sepse, os animais foram submetidos aos testes de habituação ao campo aberto, *splash test* e nado forçado. Ao término dos testes comportamentais, os animais foram mortos por decapitação em guilhotina, e o córtex frontal e hipocampo foram retirados e armazenados em freezer -80°C para a realização das análises de níveis de citocinas e de estresse oxidativo, conforme demonstrado no apêndice A.

3.3.1 Protocolo de ECM

O protocolo para indução do ECM foi adaptado de Gamaro e colaboradores (2003) e de Garcia e colaboradores (2009), com o objetivo de induzir os animais ao estresse, e gerar comportamento do tipo depressivo a partir da exposição comumente a um conjunto de estímulos ambientais, aversivos crônicos e moderados, por um período de 40 dias.

Os animais foram divididos em grupo controle (não estressados) e grupo ECM (estressados). Na tabela 2 estão descritos os estressores usados nos animais do grupo ECM. Esses estressores foram empregados em horários diferentes e alternados para que não houvesse a habituação dos animais a esses estímulos. Foi aplicado um estímulo por dia, conforme a tabela no apêndice B. Os animais do grupo controle foram mantidos nas suas gaiolas com comida e água *ad libitum* e ambiente controlado, livre de estresse.

Tabela 2 – Agentes indutores de estresse nos animais.

Estressor	Descrição
Privação de comida	Os animais foram privados de comida pelo período de 24 horas.
Privação de água	Os animais foram privados de água pelo período de 24 horas.
Contenção	Os animais foram contidos por 3 horas em um tubo de plástico de 25cm x 7cm.
Contenção + frio	Os animais foram contidos em um tubo de plástico de 25cm x 7cm e expostos a temperatura de 4°C, por 2 horas.
Exposição à luz estroboscópica	Os animais foram colocados em uma sala escura e expostos a uma lâmpada estroboscópica de 40W que ficava piscando em uma frequência de 60 vezes/min, durante 3 horas.
Isolamento	Os animais foram colocados em 1 caixa separado dos demais (1 animal por caixa) no período de 72 horas.

Fonte: Dados do autor, 2017.

3.3.2 Teste da ingestão de alimento doce

A diminuição da ingestão de alimento doce (anedonia), em modelos experimentais, é uma característica comportamental similar à perda de interesse ou prazer e sintomas de melancolia apresentados por humanos diagnosticados com depressão (Garcia et al., 2009). Esse teste propôs avaliar os animais após a indução do ECM, com duração de sete dias, para observar se há comportamento anedônico.

Ele foi realizado numa caixa retangular (40 × 15 × 20 cm) com piso e paredes laterais de madeira, dividida em 9 retângulos iguais, por linhas pretas. Dez *fruit loops* (cereal feito de trigo, amido de milho e sacarose)

(Kellogg's®) foram colocados nessa caixa, distribuídos em nove quadrantes. Logo após, o animal era colocado nesse aparato.

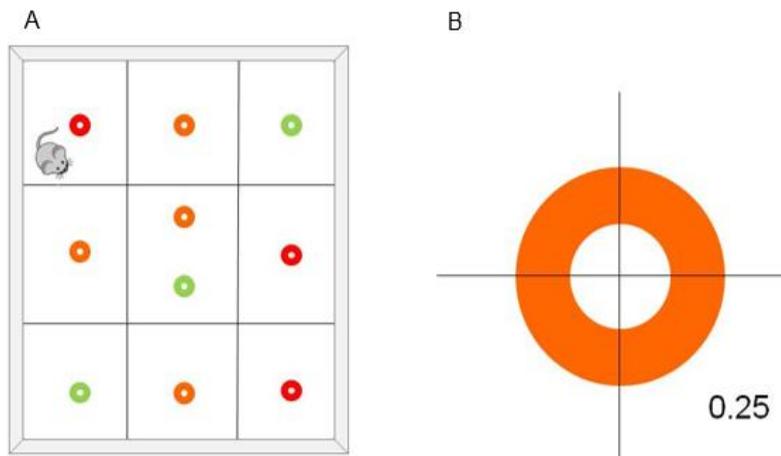


Figura 4 - Aparato utilizado para a realização do teste de anedonia. Em “A” demonstra a distribuição de cada *Froot loops* no aparato utilizado para realização do teste de anedonia. Em “B” demonstra a divisão do *Froot loops* e a medição do consumo, sendo que cada parte(1/4) consumida pelo animal corresponde a 0,25 do cereal. **Fonte:** Dados do autor, 2017.

Os animais foram submetidos a cinco dias de ensaios, uma vez por dia durante três minutos, para se tornarem familiarizados com a comida. Depois de serem habituados, os animais foram expostos a duas sessões de teste de três minutos cada, onde era observada a quantidade de *froot loops* consumida pelo animal. (Katz et al 1981b; Gamaro et al 2003).

Durante os primeiros cinco dias, os animais foram expostos a jejum por 22 horas antes da contagem de *Froot Loops*, depois os animais foram expostos a uma alimentação padrão, durante 2h. No entanto, nas sessões de teste (últimos dois dias), os animais não estavam em jejum.

3.4 MODELO ANIMAL DE SEPSE

A sepse intra-abdominal foi produzida usando a técnica de CLP (Fink et al., 1990). Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (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 íleo-cecal com fio seda 3-0, mantendo assim a continuidade intestinal. Logo após, o ceco foi perfurado com uma agulha número 14 na face antimesentérica e sutilmente comprimidos até a extrusão de conteúdo fecal. Os planos cirúrgicos foram fechados e os animais foram observados em caixa de recuperação por duas horas.

O grupo sepse recebeu um “suporte básico” de salina em 50 mL/kg imediatamente e 12 horas após CLP, mais ceftriaxona em 30 mg/kg e clindamicina em 25 mg/kg a cada 6 horas, em um total de 3 dias.

O grupo controle também foi submetido à laparotomia, porém o ceco foi manipulado pelo mesmo período de tempo, 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 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

3.5.1 *Sickness behavior* e controle da mortalidade

A avaliação do SB possui o objetivo de avaliar o comportamento doentio, como a avaliação da ingestão de alimentos e água e as alterações no peso corporal do animal (Dantzer et al., 2011). Os animais foram acompanhados diariamente após a indução da sepse por um período de oito dias. Para cada caixa contendo cinco animais foram medidas em balança analítica 500g de ração e em proveta, 900ml de água. O peso corporal dos animais também foi avaliado (Dantzer, 2001; Dantzer and Kelley, 2007; Dantzer et al., 2008). Vinte e quatro horas após, foram mensuradas a quantidade ingerida de água e comida e o peso corporal.

Concomitantemente, foi avaliada a taxa de sobrevivência dos animais durante 10 dias, registrando os animais que morreram conforme o grupo e o dia (Michels et al., 2015).

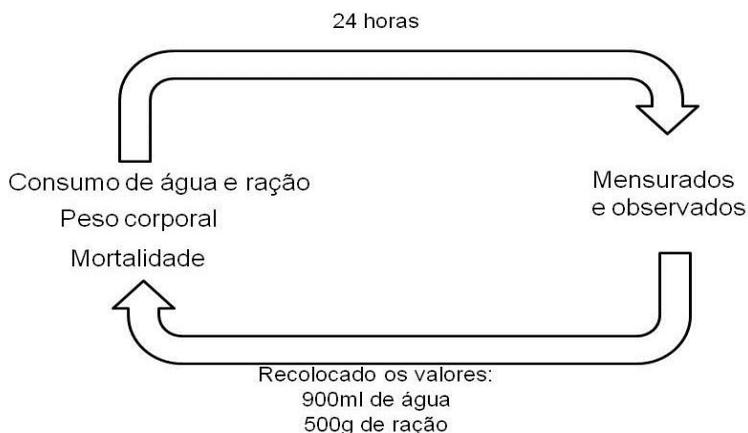


Figura 5 - Protocolo para a avaliação do SB e avaliação da mortalidade. **Fonte:** Dados do autor, 2017.

3.5.2 *Splash test*

O splash test é um válido marcador comportamental de anedonia em animais, induzido por modelos de depressão. Após aplicar uma solução de sacarose, avalia-se tempo de *grooming*, que são movimentos de autolimpeza realizados pelo animal, como exemplo uma lambida ou lavagem ou aliciamento dos pêlos no rosto, cabeça e tronco, conforme a figura 7 (Ducottet et al., 2003). Este teste avalia o autocuidado e o comportamento motivacional dos animais.

O teste consiste em uma borrifada de solução de sacarose 10% (0,35 mL por rato) na parte dorsal do animal. Após o esguicho, o animal é colocado em um campo aberto (caixa retangular - 40 × 60 cm - com paredes de 50 cm de altura sendo três paredes de madeira e uma de vidro transparente) e observado os movimentos de *grooming* durante cinco minutos (Surget e Belzung, 2008; Isingrini et al., 2010).

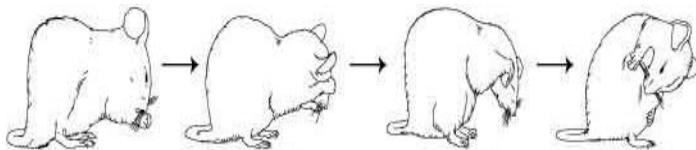


Figura 6 – Movimentos de *grooming*. Da esquerda para a direita, observam-se movimentos simétricos em forma de elipse ao redor do nariz; movimentos unilaterais envolvendo uma pata, que alcançam até as vibrissas; movimentos amplos bilaterais feitos simultaneamente; e movimentos prolongados de “lambidas” do corpo. **Fonte:** Berridge et al., 2005.

3.5.3 Atividade locomotora exploratória

O teste de campo aberto refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente. Abrangem as respostas reflexas atencionais imediatas e as respostas voluntárias típicas. O teste consiste em expor o animal a um ambiente novo, com intuito de explorar o mesmo. Os movimentos realizados pelo animal são considerados um indicador de atividade locomotora e exploratória (Vianna et al., 2000).

O teste comportamental de atividade locomotora possui uma única sessão com duração de cinco minutos e é realizado em uma caixa retangular (40 × 60 cm) com paredes de 50 cm de altura, sendo três paredes de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em nove retângulos iguais por linhas pretas.

Nesse teste são observados dois parâmetros: o *crossing* e o *rearing*. O *crossing* corresponde à atividade locomotora do animal, o qual é contado a partir do cruzamento do animal pelos quadrantes. Já o *rearing* está relacionado à atividade exploratória, sendo contabilizada a quantidade de vezes que o animal se levanta sob as patas traseiras (Vianna, et al., 2000).

3.5.4 Nado forçado

O teste de nado forçado foi desenvolvido a partir de um modelo animal de depressão, sendo muito utilizado para testar medicamento antidepressivo. Estudos apontam que animais com comportamento do tipo depressivo possuem um tempo de imobilidade maior que de animais não depressivos, e esse tempo pode diminuir com o uso de antidepressivos (Porsolt, et al., 1977; Comim et al., 2010).

No teste comportamental de nado forçado, o rato foi colocado em um cilindro contendo água (23 °C) em uma quantidade na qual o animal não consiga apoiar as patas no fundo do cilindro. No primeiro dia foi realizado o treino, onde o animal foi colocado a nadar durante 15 minutos. Após 24h do treino, o animal foi colocado novamente no cilindro, e realizado o teste, que possui duração de cinco minutos. No teste foi observado o tempo de imobilidade (tempo que o animal fica imóvel na água); tempo de mergulho (tempo que o animal fica submerso); e o tempo de escalada (tempo que o animal fica escalando as bordas do cilindro) (Porsolt, et al., 1977).

3.6 REMOÇÃO DAS ESTRUTURAS

Os animais foram decapitados por guilhotina. Logo após, o cérebro foi removido e dissecado e as estruturas de córtex frontal e hipocampo foram identificadas, extraídas e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise. Após todo o experimento, o armazenamento da carcaça dos animais foi feito utilizando saco branco leitoso, que foi depositado no freezer da universidade e coletado e transportado por empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos estão de acordo com a RDC 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

3.7 AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO

3.7.1 Mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são formadas como um subproduto da peroxidação lipídica. O teste consiste em avaliar os níveis de malondialdeído (MDA) presente na amostra, bem como gerado a partir de hidroperóxidos de lípidos. O MDA é uma substância reativa ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico, formado durante a peroxidação em sistemas de membranas (Draper e Hadley 1990).

Primeiramente a amostra é homogeneizada com seu tampão específico (Na_2PO_4 - KCl). Logo após é utilizado 500 μL da amostra e adicionado o ácido tricloroacético (TCA) a 10% (porção 1:2). O conteúdo é centrifugado (10 min em 1000 rpm) e adicionado ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.67%. As amostras foram aquecidas por 30 min. O MDA reage

com o ácido tiobarbitúrico gerando um produto coloração rósea, lido espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 532 nm (Draper e Hadley 1990).

3.7.2 Mensuração dos grupamentos carbonila

A medida do dano oxidativo em proteínas foi determinada pela medida de formação de grupos carbonila, que são produto do ataque de radicais livres aos resíduos de proteínas, como aminoácidos histidina, arginina, lisina e prolina (Levine et al., 1994).

Primeiramente a amostra é homogeneizada com seu tampão específico (KCl-KH₂PO₄). Logo após é utilizado 200 µL da amostra, adicionado 100 µL TCA 20% e centrifugado (14000 rpm, 5 min). Em seguida, é adicionado 100 µL de hidróxido de sódio (0,2 molar) e 100 µL de 2,4-Dinitrofenilidrazina (DNTP). A amostra foi incubada por 60 min. e adicionado TCA 20%. Em seguida foi adicionado uma mistura de etanol e acetato de etila e centrifugado (14000 rpm, 3 min). Logo após, foi adicionado hidróxido de sódio e aquecida a reação durante 30 min. A leitura das absorvâncias foi feita no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 370nm, conforme previamente descrito (Levine et al., 1994).

3.8 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE CITOCINAS

Para as análises dos níveis de IL-1 β , IL6 e TNF- α , foram utilizados os testes de imunoensaio (ELISA Sanduíche) através dos kits da Peprotech®. Os procedimentos para cada dosagem foram realizados de acordo com recomendações do fabricante.

As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato salina (PBS). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, adicionados em cada poço da placa e incubados *overnight*, na temperatura de 4°C. Após este período, os poços foram lavados tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS, pH 7,2). Posteriormente, as placas foram bloqueadas com 200 µL de solução de bloqueio (1% de albumina bovina sérica em PBS, pH 7,2) e incubadas.

Após a incubação e as lavagens, 100 µL de amostras e/ou padrões diluídos previamente em solução padrão de diluição (0,05% de Tween 20; 0,1% de BSA em PBS, pH 7,2) foram adicionados aos poços. As placas foram cobertas e novamente incubadas *overnight*. Após este período, os poços foram lavados e adicionados 100 µL dos anticorpos de detecção TNF- α , IL-1 β e IL-6, previamente diluídos em solução padrão

de diluição. As placas foram incubadas por mais duas horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados e após o processo foi adicionado 100 μ L do polímero esptreptavidina peroxidase e as placas foram cobertas por papel alumínio e incubadas durante 30 minutos.

Após a incubação, os poços foram lavados cinco vezes com o tampão de lavagem e 100 μ L da solução substrato 3,3',5,5' -tetrametilbenzidina foram adicionados, seguido de incubação por mais 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de 50 μ L de solução de ácido clorídrico 2N sobre os poços. Depois se observou uma coloração amarelada que é lida em espectrofotômetro, utilizando um comprimento de onda de 450 nm.

3.9 MENSURAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS

A mensuração das proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry (1951) e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão. Para a realização da técnica, utiliza-se 10 μ L da amostra e é adicionado 1 mL de Reativo C (Hidróxido de sódio 0,1 molar, carbonato de sódio 2%, sulfato cúprico e tartarato de sódio/potássio). Logo após, foi adicionado Folin e a leitura foi feita em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 700nm.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes comportamentais foram avaliados através da média e o erro padrão da média, sendo a diferença entre os grupos calculados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste *post hoc* Tukey. O teste de anedonia foi avaliado pelo teste *t de Student* para amostras independentes. O SB foi avaliado através de análise de variância (ANOVA) de três vias, seguido do teste *post hoc* Tukey.

Para as análises imunológicas e bioquímicas, os dados foram expressos em média e erro padrão da média, sendo a diferença entre os grupos analisada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* Newman-Keuls. A curva de sobrevivência foi avaliada pela mediana e porcentagem de sobrevivência utilizando o teste de *Kaplan-Meier*. A significância estatística foi considerada para valores de $P < 0,05$ em todas as análises.

Os programas utilizados nas análises foram *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) 20 e o *GraphPad Prism 5*.

4 RESULTADOS

4.1 CONSUMO DE SACAROSE

Antes da indução do modelo CLP foi realizado o teste de anedonia (figura 7) a fim de confirmar se os animais estavam estressados e apresentavam comportamento anedônico. Nesse experimento, os animais do grupo ECM, os quais foram aplicados o protocolo de estresse crônico, diminuíram o consumo de sacarose, comparados com os animais do grupo controle que não foi exposto ao ambiente estressante ($F=1,007$, $df=74$, $P=0,009$).

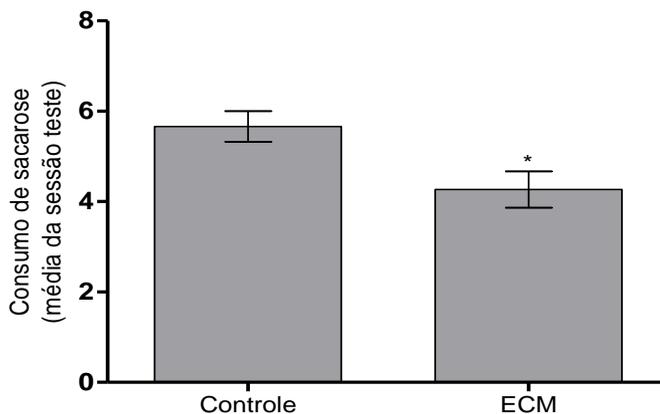


Figura 7 – Representação gráfica dos resultados do teste comportamental anedonia. O gráfico representa média e o \pm EPM do consumo da sessão teste. As comparações foram realizadas utilizando o teste *t de Student* para amostras independentes, $*P<0.05$ vs. Controle. $n = 50$ animais por grupo.

4.2 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA

Conforme a figura 8, houve uma queda significativa da taxa de sobrevivência nos animais CLP, nos primeiros dias após a indução do processo inflamatório. Porém, no sexto dia, essa taxa se manteve constante (sem nenhuma morte). A taxa varia entre 20% a 40% de sobrevivência dos animais dos grupos Controle+CLP e ECM+CLP,

enquanto nos animais do grupo Controle+Sham, essa taxa varia de 90% a 100%, sugerindo que a sepse por si só gera um alto índice de mortalidade.

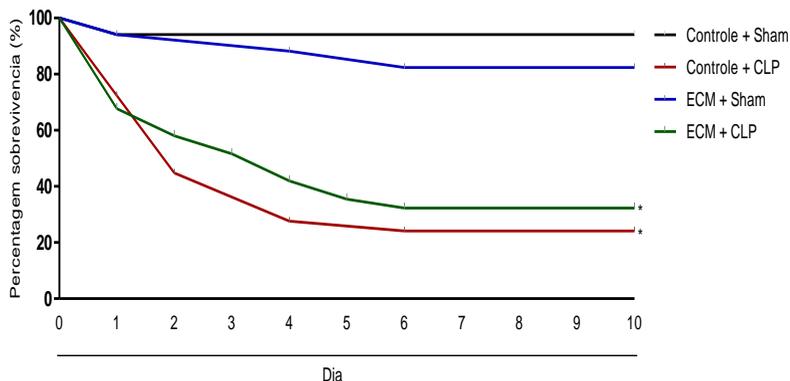


Figura 8 – Representação gráfica da curva de sobrevivência. Curva de sobrevivência de tempos de Kaplan-Meier após a indução da sepse. * $P < 0.05$ vs. Controle+Sham. Os dados foram analisados para *log-rank*.

4.3 SICKNESS BEHAVIOR

Após a indução da sepse, foram avaliados, a cada 24 horas, o consumo de água (A), comida (B) e mensurado o peso corporal (C) dos animais, durante 8 dias após a indução da sepse (figura 9). No entanto, no SB não houve diferença estatisticamente significativa tanto nos animais sépticos quanto nos animais ECM. Sugere-se apenas uma tendência para diminuição do consumo de comida e do peso corporal nos animais dos grupos sépticos.

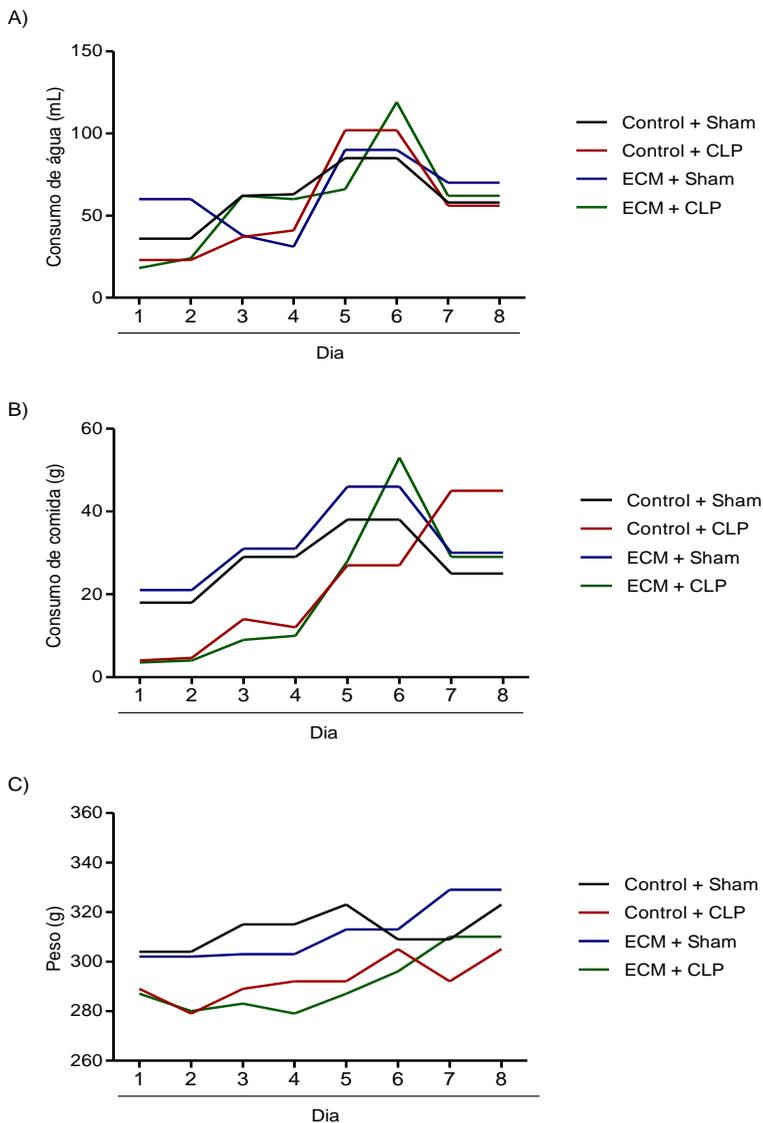


Figura 9 – Representação gráfica do teste de SB. O gráfico representa a média \pm EPM dos grupos em cada dia avaliado, em A mostra o consumo de água por mL; B consumo de comida em g; C o peso corporal dos animais. As comparações foram feitas por ANOVA de três vias, seguido pelo teste *post hoc* Tukey.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA

No teste de campo aberto (figura 10) observou-se uma diminuição da atividade locomotora (*crossing*) e exploratória (*rearing*) nos grupos Controle+CLP e ECM+CLP, comparados ao grupo Controle+Sham ($F=4,609$, $df=33$, $P=0,039$), ($F=2,103$, $df=33$, $P=0,156$), respectivamente. Como observado, os animais sépticos têm uma diminuição significativa nas atividades locomotora e exploratória, comparado ao grupo Controle+Sham. Porém, não foi observada diminuição significativa deste parâmetro no grupo Controle+ECM.

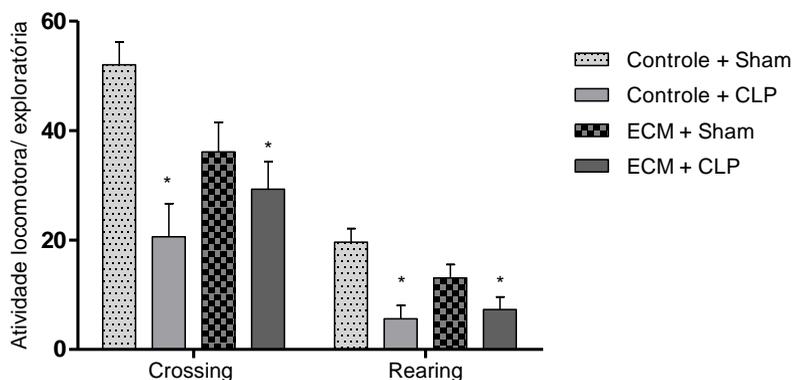


Figura 10 – Representação gráfica dos resultados do teste comportamental de atividade locomotora e exploratória. As barras representam a média \pm EPM, calculados por ANOVA de duas vias seguido do *post hoc* de Tukey. * $P < 0,05$ vs Controle+Sham.

4.5 SPLASH TEST

O *splash test* é um válido marcador de comportamento anedônico sendo usado em modelos de depressão. Nele foi avaliado o tempo de *grooming*, representado na figura 11. Observou-se uma diminuição desse tempo nos grupos Controle+CLP e ECM+Sham, comparados ao Controle+sham ($F=12,193$, $df=30$, $P=0,001$). Inesperadamente, animais que foram submetidos ao ECM e a sepse (grupo ECM+CLP) não apresentaram alterações significativas no tempo de *grooming*, quando comparados aos animais do grupo Controle+Sham.

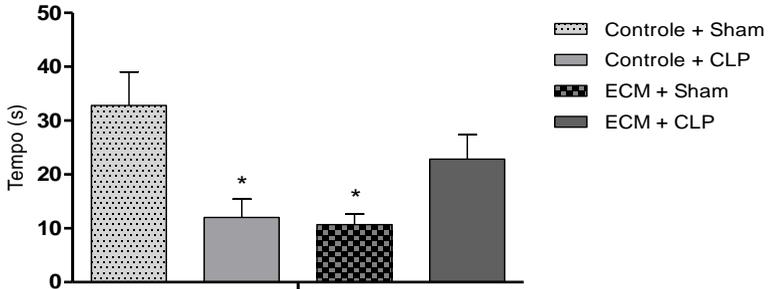


Figura 11 - Representação gráfica do resultado do teste comportamental *splash test*. As barras representam a média ± EPM do tempo de *grooming*, calculados por ANOVA de duas vias seguido do *post hoc* de Tukey. * $P < 0.05$ vs Controle+Sham.

4.6 TESTE DE NADO FORÇADO

No teste de nado forçado foram observados os parâmetros de tempo de imobilidade, nado e mergulho, como representado na figura 12. Ao analisar estatisticamente, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos três parâmetros (Imobilidade: $F=0,680$, $df=31$, $P=0,415$; Nado: $F=0,086$, $df=31$, $P=0,771$; Escalada: $F=3,299$, $df=35$, $P=0,077$), sugerindo que tanto o ECM quanto a sepse, nesse experimento, não induziram alterações no teste de nado forçado.

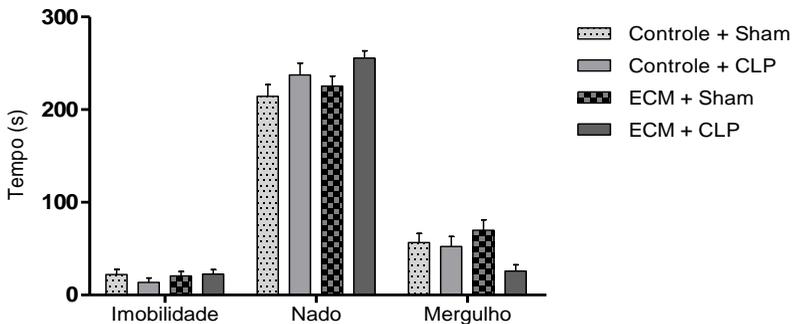


Figura 12 - Representação gráfica dos resultados do teste comportamental de nado forçado. As barras representam a média ± EPM do tempo de imobilidade, nado e mergulho, calculados por ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc* de Tukey. * $P < 0.05$ vs Controle+Sham.

4.7 AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO

O teste de TBARS demonstra a quantidade dos subprodutos da peroxidação lipídica. No presente estudo, foram observados os níveis de MDA no córtex frontal e hipocampo, conforme a figura 13.

Observou-se um aumento dos níveis de TBARS no córtex frontal dos grupos Controle+CLP e ECM+CLP, comparados ao grupo Controle+Sham ($F=0,013$, $df=23$, $P=0,906$). No hipocampo, houve um aumento nos níveis de TBARS no grupo ECM+CLP, em comparação ao grupo Controle+Sham ($F=0,034$, $df=21$, $P=0,855$). Adicionalmente, não houve alteração significativa no grupo Controle+CLP, em relação ao grupo Controle+Sham.

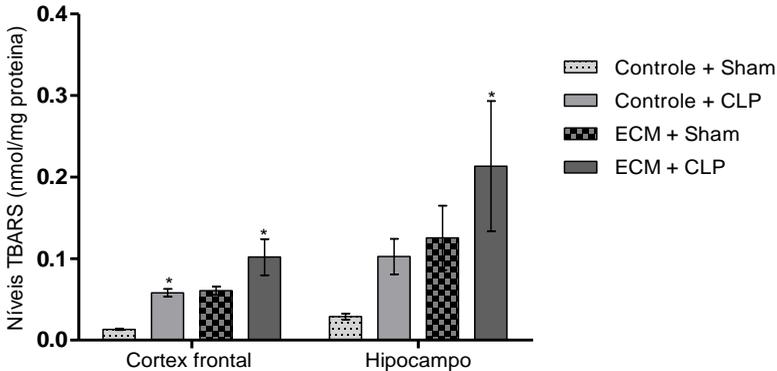


Figura 13 - Representação gráfica dos resultados do teste TBARS. Níveis de TBARS por nmol/mg de proteínas nas estruturas cerebrais córtex frontal e hipocampo. As barras representam a média \pm EPM, calculados por ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc* de Newman-Keuls. * $P<0.05$ vs Controle+Sham.

A medida do dano oxidativo em proteínas foi determinada pelo nível de formação de grupos carbonila. Esses grupos carbonila foram mensurados no tecido cerebral de córtex frontal e hipocampo, como mostra a figura 14. No córtex frontal, houve um aumento destes níveis nos grupos Controle+CLP, ECM+Sham e ECM+CLP, comparados ao grupo Controle+Sham ($F=0,595$, $df=15$, $P=0,452$). No hipocampo, houve um aumento dos níveis das proteínas carboniladas nos grupos

Controle+CLP e ECM+CLP, comparados com os animais do grupo Controle+Sham ($F=0,038$, $df=13$, $P=0,542$).

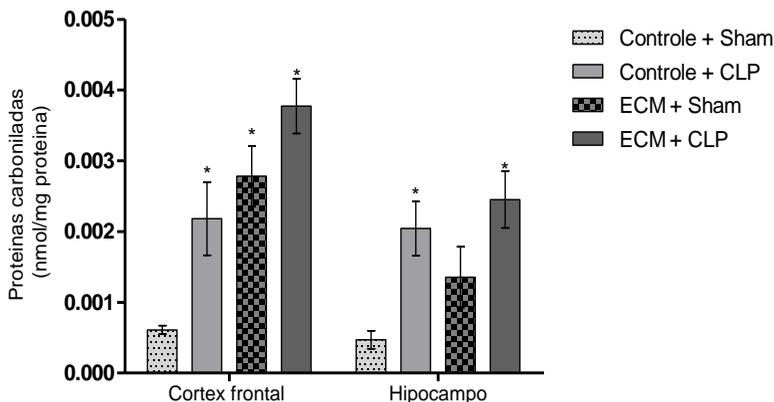


Figura 14 - Representação gráfica dos resultados do teste de carbonilação de proteínas. Níveis de proteínas carboniladas por nmol/mg de proteínas nas estruturas cerebrais de córtex frontal e hipocampo. As barras representam a média \pm EPM, calculados por ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc* de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ vs Controle+Sham.

4.8 AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CITOCINA

É sabido que a inflamação está relacionada com o comportamento depressivo e para melhor relacionar os resultados obtidos nos testes comportamentais e de dano oxidativo, foram avaliados os níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β e a IL-6) nos tecidos cerebrais de córtex frontal e hipocampo.

Os níveis de TNF- α estão representados na figura 15, que demonstra um aumento no córtex frontal de animais dos grupos Controle+CLP quando comparados ao grupo Controle+Sham ($F=21,399$, $df=21$, $P=0,0001$). No hipocampo, foi observado um aumento no grupo Controle+CLP, quando comparado ao grupo Controle+Sham ($F=2,140$, $df=22$, $P=0,157$). Em ambas as estruturas, se observou uma grande diminuição dos níveis de TNF- α no grupo ECM+CLP, quando comparado com o grupo Controle+CLP.

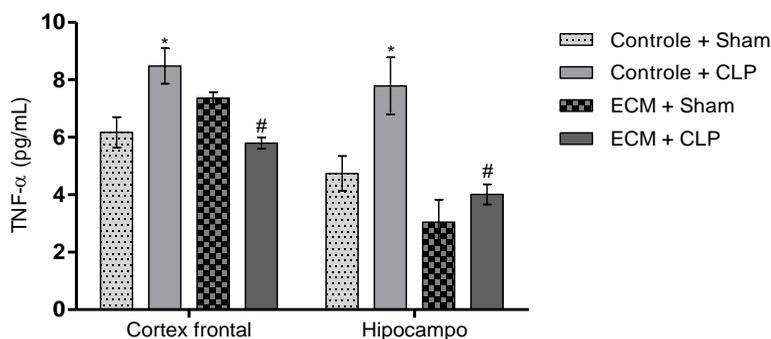


Figura 15 - Representação gráfica dos níveis de TNF- α . Níveis de TNF- α por pg/mL de proteínas nas estruturas de córtex frontal e hipocampo. As barras representam a média \pm EPM, calculado por ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc* de Newman-Keuls. * $P < 0.05$ vs Controle+Sham e # $P < 0.05$ vs Controle+CLP.

A figura 16 representa os níveis de IL-1 β observados em córtex frontal e hipocampo. Não houve alteração estatística significativa em córtex frontal, quando comparados como grupo Controle+Sham. Porém, vale ressaltar que houve uma diminuição dos níveis de IL-1 β no grupo ECM+CLP quando comparado com o grupo Controle+CLP ($F=5,098$, $df=21$, $P=0,034$).

No hipocampo, os níveis de IL-1 β estavam aumentados no grupo Controle+CLP, comparado com o grupo Controle+Sham ($F=3,385$, $df=20$, $P=0,080$). Houve uma diminuição nos níveis de IL-1 β no hipocampo dos animais do grupo ECM+CLP, quando comparado ao grupo Controle+CLP.

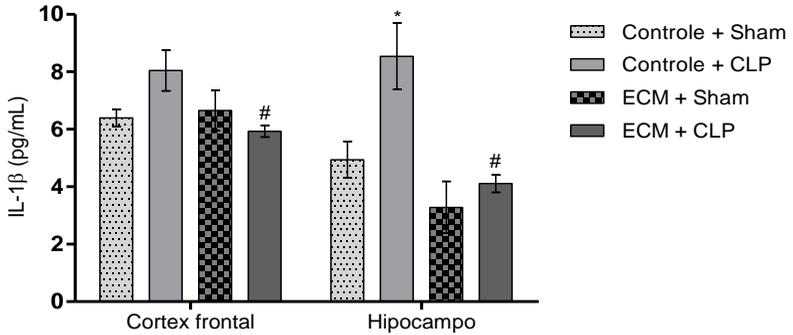


Figura 16 - Representação gráfica dos níveis de IL-1 β . As barras representam a média \pm EPM, calculado por ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc* de Newman-Keuls. * $P < 0.05$ vs Controle+Sham e # $P < 0.05$ vs Controle+CLP.

A figura 17 demonstra os níveis de IL-6, que em córtex frontal, observou-se um aumento destes níveis nos grupos Controle+CLP e ECM+Sham, em relação ao grupo Controle+Sham ($F=13,344$, $df=23$, $P=0,001$). No hipocampo, observou-se um aumento de IL-6 no grupo Controle+CLP, quando comparado ao grupo Controle+Sham ($F=2,731$, $df=20$, $P=0,114$). Porém, quando comparado o grupo ECM+CLP ao grupo Controle+CLP, houve uma diminuição dos níveis dessa citocina.

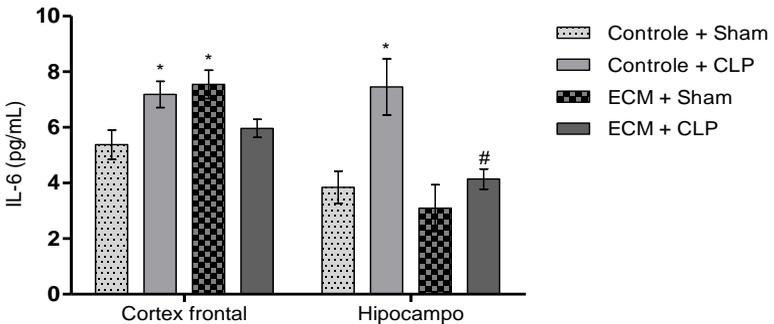


Figura 17 - Representação gráfica dos níveis de IL-6. Níveis de IL-6 por pg/mL de proteínas nas estruturas de córtex frontal e hipocampo. As barras representam a média \pm EPM, calculado por ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc* de Newman-Keuls. * $P < 0.05$ vs Controle+Sham e # $P < 0.05$ vs Controle+CLP

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve a finalidade de avaliar o impacto do estresse crônico sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos submetidos à sepse pelo modelo de CLP. Aqui foi demonstrado que o ECM reverteu o comportamento depressivo avaliado pelo *splash test* na sepse, e isso pode estar relacionado com uma diminuição nos níveis de citocinas cerebrais.

Também foi observado que os animais submetidos ao protocolo de ECM apresentam comportamento anedônico, característico do transtorno depressivo. A literatura evidencia que a perda de interesse ou do prazer podem aumentar a vulnerabilidade para o desenvolvimento de sintomas depressivos (Davidson e Echeverry 2011; Liu et al., 2016).

Estudo de Garcia e colaboradores (2009) demonstrou que ratos submetidos ao protocolo de ECM apresentaram uma redução da ingestão de alimentos doces, caracterizando um quadro de anedonia, corroborando os achados do presente estudo. Gamaro e colaboradores (2003) mostraram em seu estudo que ratos possuem preferência pela ingestão de sacarose, entretanto animais com ECM apresentam uma diminuição na sensibilidade à recompensa. De acordo com outros dados da literatura, os animais submetidos ao procedimento de ECM consomem menos alimentos doces que os animais não estressados (Chanlton et al., 2000; Angelo et al., 2008; Davidson e Echeverry, 2011), sugerindo que a anedonia pode ser resultante de quadros estressantes.

Há muitos circuitos neuronais e neuroquímicos envolvidos com a depressão e os aspectos neurocognitivos, um exemplo é o hipocampo, que está relacionado com a anedonia (Garcia et al., 2009). O comportamento anedônico está envolvido com alterações dopaminérgicas mesolímbico e mesostriatal com projeções, que, por sua vez, são influenciadas por variantes genéticas e estressores ambientais (Stein, 2008). Estudos demonstram uma diminuição da expressão de BDNF em estruturas límbicas, relacionando a atrofia dessas estruturas, incluindo o hipocampo e o córtex frontal, levando não só a anedonia, mas a sintomas depressivos, como a diminuição do peso e do consumo de alimentos (Duman e Monteggia, 2006; Castrén et al., 2007). O uso antagonistas dos receptores NMDA (AP-1, MK801 e cetamina) em modelos animais de estresse induziu uma reversão do comportamento anedônico, sugerindo ação direta sobre essas vias neuronais envolvidas com a saciedade (Jahng and Houpt 2001; Treece et al., 2008; Garcia et al., 2009; Liu et al., 2016).

Neste estudo, após a indução da sepse, foi realizado o SB, quando foi avaliado peso dos animais e consumo de água e comida. Apesar de não haver diferença estatística significativa entre os grupos, observou-se que nos dias iniciais após a sepse (1 a 4 dias) o consumo de comida e o peso dos animais estavam menores nos grupos sépticos (Controle+CLP e ECM+CLP). Acredita-se que as mudanças emocionais, como a exposição a situações estressantes, podem influenciar o comportamento alimentar. A exposição crônica a estressores pode alterar o peso corporal de ratos, conforme observaram Gamaro e colaboradores (2003). De acordo com estudo de Garcia e colaboradores (2009), ratos estressados possuem uma pequena diminuição no peso corporal. Entretanto, quando tratados com cetamina, há a “recuperação” do peso corporal, sugerindo que os receptores de NMDA podem estar modulando o comportamento alimentar no estresse.

Nesse estudo, o grupo ECM+Sham manteve os valores de peso corporal e consumo de comida semelhantes ao grupo Controle+Sham, sugerindo que o mecanismo principal envolvido na pequena diminuição desses valores nos tempos iniciais seria a sepse (no grupo Controle+CLP) em conjunto com o ECM (no grupo ECM+CLP), visto que a sepse é uma inflamação descontrolada, com um grande aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β ; IL-6 e TNF- α) que são produzidas por neutrófilos e monócitos ativados (Mina et al., 2013).

No SNC, as citocinas podem estar relacionadas com dois caminhos principais: uma via neural (representados pelos neurônios aferentes) e a via humoral que envolve a produção de IL-1 por células fagocíticas na região circumventricular e plexo coroide (Konsman e Dantzer, 2002). A IL-1 produzida no SNC pode levar a redução do comportamento social e a diminuição do consumo de comida em modelos animais (Dantzer et al, 2011). Estudos utilizando modelo de neuroinflamação com uso de LPS mostraram que a administração de IL-1 β induziu a atividade dos componentes da reação de fase aguda, incluindo febre, ativação do eixo HPA e comportamento depressivo (Dowlati et al, 2010; Dantzer et al, 2011). Porém, a IL-1 β não é a única citocina envolvida nesse processo, pois a IL-6 está envolvida com a potencialização do comportamento depressivo causada pela IL-1 β (Li et al, 2008; Yirmiya et al, 2011; Liu et al, 2014). De fato, uma das primeiras manifestações cerebrais mediadas pelos quadros infecciosos, são pequenas alterações enquadradas no SB (Dantzer et al, 2002; 2011).

A sepse, por ser uma doença infecciosa e causar danos em vários sistemas biológicos, possui um alto índice de mortalidade. Nesse estudo não foi diferente, os animais dos grupos sépticos tiveram uma maior

taxa de mortalidade, quando comparados aos grupos Sham. O ECM não produziu efeito significativo na taxa de sobrevivência dos animais. Corroborando esse achado, Michels e colaboradores (2015) demonstraram que a sepse desencadeia uma disfunção cerebral que está associada as elevadas taxas de mortalidade. No mesmo estudo, foi administrado anti-CD40 em ratos sépticos (CLP) e se observou que esse anticorpo leva a efeitos protetores, porém em doses altas (100 µg / kg), não foi capaz de melhorar a mortalidade. Um estudo recente utilizando modelo animal de sepse injetou um composto Anti-PD-L1, que eleva a atividade imunológica, inibindo a morte celular programada-1 em células imunes e foi demonstrado que este composto melhorou significativamente a sobrevivência dos animais sépticos (Shindo et al., 2017)

Sabe-se que a EAS leva a uma menor taxa de sobrevivência, tanto em modelos animais de sepse, quanto em pacientes. Associações têm sido realizadas para entender a relação entre EAS e a maior mortalidade (Tomasi et al., 2016; Singer et al., 2016). Uma relação estabelecida, em modelos animais, é a do dano oxidativo que ocorre nas células neuronais do SNC. Estas, em conjunto com outras disfunções, elevam a taxa de mortalidade, bem como induzem a disfunção cognitiva nos sobreviventes da sepse (Barichello et al., 2007; Steckert et al., 2013; Schwalm et al., 2014; Heneka, 2014; Mina et al., 2014). Como demonstrado em modelo animal, em humanos há uma alta taxa de mortalidade causada pela sepse, podendo estar relacionada a alguns fatores, como os aspectos da infecção (patógeno, lesão), sistema imunológico, presença de comorbidades (diabetes, hipertensão), histórico de saúde, metabolismo e as respostas fisiológicas a infecção, além de cuidados realizados pela equipe de saúde, diagnóstico e tratamento precoce (Young et al, 1990; Bolton, 1996; Dinarello, 2004; Silva et al., 2004; Singer et al., 2016).

Estudo Singer e colaboradores (2016) mostraram que pacientes sobreviventes a uma disfunção da resposta inflamatória apresentam dano cognitivo e piora de algumas funções cerebrais. Outros estudos também mostraram que ratos sobreviventes a sepse apresentaram dano cognitivo em 10, 30 e 60 dias após a indução por CLP (Comim et al., 2007, 2008, 2011; Semmler et al., 2008; d'Avila et al., 2008; Steckert et al., 2013; Biff et al., 2013). De fato, aqui foi demonstrado que animais submetidos ao protocolo de estresse crônico (40 dias) e 10 dias após a indução de sepse por CLP apresentam uma diminuição da atividade locomotora (*crossing*) e exploratória (*rearing*) nos grupos Controle+CLP e ECM+CLP, quando comparados ao grupo Controle+Sham.

Corroborando este estudo, Comim e colaboradores em 2008 e em 2011 demonstraram alterações locomotoras e exploratórias em animas CLP, justificando essas alterações com o desenvolvimento do processo inflamatório e o dano oxidativo, ocasionando alterações no SNC, levando a um comprometimento dessa atividade. Barichello e colaboradores (2005, 2007) demonstram em seus estudos que as alterações comportamentais podem ser derivadas das disfunções que a sepsé gera no SNC, tais como a quebra da BHE, disfunção na cadeia respiratória mitocondrial, aumento de ERO, e o aumento dos níveis de citocinas. O uso de inibidores de metaloproteiniase 2 e 9 (enzimas reguladoras da BHE envolvidas na resposta inflamatória) em modelo animal de CLP mostrou um padrão locomotor e exploratório semelhante aos animais controle, além de apresentarem uma preservação da memória de habituação (Dal-Pizzol et al., 2013).

No presente estudo, no teste de campo aberto, não foi observada diminuição significativa da atividade locomotora e exploratória no grupo controle ECM, sugerindo que o ECM não afetou significativamente esse parâmetro comportamental. Corroborando estes achados, Liang e colaboradores (2008), utilizando modelos animais de ECM induzido por fatores ambientais, demonstraram que não houve alteração significativa na atividade locomotora e exploratória dos animais estressados, quando comparados aos animais do grupo não estressado. Neste mesmo estudo foi realizado o teste de natação forçada, que mostrou uma diminuição do tempo de imobilidade dos animais quando tratados com antidepressivos (Clomipramina), em relação aos animais controles estressados.

No teste de nado forçado, o animal apresenta um comportamento de luta, caracterizado por vigorosa atividade. Esta, após alguns minutos diminui até que os animais passam a fazer somente os movimentos necessários para manter a cabeça fora da água (Porsolt et al., 1977). Devido ao exercício físico e ao componente emocional, relacionado à impossibilidade de fuga para o animal, o teste de nado forçado também é usado em estudos sobre a fisiologia do estresse, como um potente agente estressor (Tanno et al., 2002). A movimentação do animal na água está correlacionada com suas chances de sobrevivência. Assim, a diminuição da atividade, caracterizada pela imobilidade, representaria uma resposta adaptativa, no modelo de estresse por natação (Porsolt et al., 1977; McEWEN et al., 2000). Neste estudo, foram observados três parâmetros no teste de nado forçado, porém não houve diferença significativa entre os grupos, sugerindo que o ECM não gerou alterações no teste de nado forçado, igualmente para a sepsé, que não influenciou

nesse teste, ou seja, os animais desenvolveram uma resposta adaptativa ao ambiente inserido.

Uma das tarefas de comportamento mais utilizadas para avaliar o comportamento depressivo é o *splash test*. Este teste possui o intuito de avaliar o autocuidado e o comportamento motivacional (Willner et al., 2005). Com o borrifamento da solução de sacarose, é possível correlacionar a frequência e o tempo de *grooming*, que pode ser expresso como uma medida indireta do consumo de sacarose que no ECM pode estar alterado (Willner, 2005).

Animais submetidos ao ECM tem uma diminuição da quantidade de *grooming*, quando comparados aos animais não estressados. Piatto e colaboradores (2008) observaram que o uso de substância antidepressiva (Marapuama) reverte a diminuição na quantidade de *grooming* causado pelo estresse. Algumas evidências têm mostrado que o *grooming* é um comportamento “auto-facilitado”, pois o animal pode alterar o tempo e a quantidade, sendo que o primeiro *grooming* funciona como um estímulo para os próximos (Spruijt, et al., 1992; Komorowska e Pisula, 2003; Schulz et al., 2007). Este movimento pode ser induzido nos modelos animais através da administração de ACTH (no núcleo paraventricular hipotalâmico) ou ainda, a administração de oxitocina, substância p e o fator de liberação de corticotrofinas (Spruijt, et al., 1992).

Spruijt e colaboradores (1992) mostram em seu estudo as razões pelas quais um episódio de *grooming* (tempo, tipo, quantidade do movimento) são importantes em modelos animais de estresse e ansiedade, considerando ele como um estilo de *coping* comportamental, pois o mesmo foi sugerido como indicador da habituação ou redução de excitação em resposta a algo novo (Komorowska e Pisula, 2003). Em modelos animais foi observado o aumento de *grooming* com o uso de agonista GABA, e redução de *grooming* com o uso de antagonista GABA, sendo assim sugerido que o sistema gabaérgico está envolvido nessa resposta (Osborne et al., 1993). Um estudo de Schulz e colaboradores (2007) demonstrou que o tratamento crônico com um antidepressivo (inibidor seletivo de recaptação de serotonina - fluoxetina) leva ao aumento do tempo de *grooming*, quando comparados ao grupo controle.

O ECM em modelos animais pode levar a uma diminuição desse parâmetro, pois uma das características do estresse é a redução da excitação (Ollmayr e Henn, 2003; Maxime et al., 2007; Schulz et al., 2007; Bagot et al., 2014). No presente estudo, como esperado, observou-se uma diminuição no tempo de *grooming* nos grupos Controle+CLP e ECM+Sham. Curiosamente, os animais que foram estressados pelo

ECM mostraram uma melhora no tempo de *grooming* quando submetidos a CLP, sugerindo que o ECM induziu um pré-condicionamento a um estressor agudo adicional (sepsis).

Além disso, Estudos demonstram que o envolvimento de estresse oxidativo e da inflamação no SNC é um passo importante para o desenvolvimento de encefalopatia séptica. Além disso, esses dois mecanismos estão associados aos déficits de comportamento a longo prazo apresentado por modelos animais de sepsis (Mina et al., 2014; Schwalm et al., 2014; Hernandez et al., 2014). Atualmente, busca-se entender se a inflamação no SNC e danos oxidativos são consequência da inflamação sistêmica ou se eles são conduzidos pelas células da microglia ou astrócitos (Michels et al., 2014).

O cérebro é rico em ácidos graxos polinsaturados e tem um mecanismo de defesa antioxidante pobre, sendo assim particularmente sensível aos danos oxidativos (Manoli et al., 2000). Os efeitos da ECM sobre o estresse oxidativo do cérebro demonstraram ser diversos de acordo com a região do cérebro (Manoli et al., 2000; Madrigal et al., 2006). A sepsis também aumentou o dano oxidativo nos tecidos cerebrais, mas aqui não foram observados efeitos significativos da ECM sobre a lesão oxidativa do cérebro induzida pela sepsis. Foi observado apenas um pequeno aumento dos níveis de TBARS no hipocampo, sugerindo que a modulação do dano oxidativo do cérebro não é responsável para o efeito protetor observado na avaliação do tempo de *grooming*.

Semmler e colaboradores (2008) e d'Ávila e colaboradores (2008), demonstraram que na sepsis os animais apresentaram alterações no metabolismo energético cerebral, principalmente alterações nos complexos mitocondriais, que por vez, essas alterações podem levar a produção de ERO. A inflamação também é geradora de ERO, pois as células do sistema imune produzem NO e o ácido hipocloroso (HOCL), que é um agente microbiano, que pode interagir e formar a radical hidroxila (OH), que é uma espécie danosa ao organismo. As ERO produzidas no SNC podem levar a morte neuronal, principalmente porque elas podem gerar um estado de lipoperoxidação, gerando hidrocarbonetos, aldeídos e outros produtos altamente citotóxicos, que por sua vez, geram a perda do controle da permeabilidade da membrana celular. Além da peroxidação lipídica, os radicais livres podem oxidar aminoácidos, resultando na formação de grupos carbonilas, tióis oxidados, entre outras modificações que alteram a função e a estrutura normal da proteína (Papadopoulos et al., 2000; Semmler et al., 2005; Barichello et al., 2007; Steckert et al., 2014).

Corroborando os achados desse estudo, foi observado que o dano oxidativo cerebral ocorre em tempos iniciais da sepse. Estas alterações oxidativas persistem por até 10 dias após a indução da sepse (Comim et al., 2011). Porém, em um estudo recente foi observado que houve um aumento nos níveis de TBARS em córtex frontal após 30 dias da indução de sepse por CLP e ainda, um aumento da quantidade de grupos carbonila no estriado após 30 e 60 dias da indução da sepse (Steckert et al., 2013). Além disso, Barichello et al. (2007) com modelos animais de sepse demonstrou aumento dos níveis de TBARS e grupos carbonila em hipocampo, que foi revertido com o uso de tratamento antioxidante. Consequentemente, os animais tiveram uma melhora na memória de habituação, tal como no teste de esQUIVA inibitória (memória aversiva), relacionando a terapia antioxidante (n-acetilcisteína + deferroxamina) na melhora do dano cognitivo após 10 dias da sepse.

Em diferentes situações estressantes, uma resposta fisiológica comum é o aumento da taxa metabólica, o que leva ao aumento da geração de produtos de oxidação e consequente desequilíbrio entre as ERO e as defesas antioxidantes (Zhang et al., 2009). Em animais submetidos ao ECM vem sendo apontada a diminuição nas defesas antioxidantes tanto enzimáticas quanto as não enzimáticas, em tecidos cerebrais (córtex e hipocampo) (Boufleur et al., 2012). Adicionalmente, um aumento da oxidação de proteínas no córtex frontal, hipocampo, estriado e córtex; na peroxidação lipídica no cerebelo e estriado; na atividade da catalase no cerebelo, hipocampo, estriado, córtex; e uma diminuição da atividade da superóxido dismutase no córtex frontal, hipocampo, estriado e córtex após a indução do protocolo de ECM (40 dias) foram observados no estudo de Lucas e colaboradores (2009). Nesse estudo, o grupo ECM+Sham apenas apresentou um aumento significativo na carbonilação de proteínas, quando comparado ao grupo Controle+Sham. Paralelamente foi observado um aumento nos níveis tanto de TBARS quanto da carbonilação de proteínas no grupo ECM+CLP, sugerindo que a sepse pode induzir ao dano oxidativo, que pode ser elevado em conjunto com o ECM.

Quando avaliado o dano oxidativo, observou-se que este não consegue responder ao efeito protetor gerado no *splash test*. Então, foi realizada a dosagem das citocinas pró-inflamatórias. Bauhofer e colaboradores (2004) e Cauvi e colaboradores (2012) relatam que o TNF- α e a IL-1 β parecem mediar a maioria dos distúrbios fisiológicos que ocorrem na sepse e a IL-6 pode intensificar a resposta inflamatória, e ainda exercer um papel no reparo tecidual (propriedades pró e antiinflamatórias) e regular a produção de TNF- α e IL-1 β . No presente

estudo, foi observado que os níveis de TNF- α e IL-6 aumentaram no grupo Controle+CLP, em comparação ao grupo Controle+Sham, tanto no córtex frontal como no hipocampo. Os níveis de IL-1 foram aumentados apenas no hipocampo após a sepse. De modo geral, o ECM diminuiu significativamente os níveis de citocinas em animais sépticos, em comparação com ratos sépticos não estressados.

Os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 estão significativamente aumentados no fluido cerebrospinal de crianças com encefalopatia, além de estarem relacionados aos danos cognitivos e aos efeitos deletérios sobre o tecido cerebral (Oberholzer et al., 2011). Em modelos animais, os níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6) estão aumentados em tecido cerebral de ratos em 6, 12 e 24 horas após a indução de sepse por CLP (Comim et al., 2011; Mina et al., 2014). Em um estudo foi utilizado o inibidor de IL-1 β , em animais CLP, e foi observado uma reversão do déficit cognitivo apresentado por animais sépticos (10 dias após a sepse e o uso do inibidor) nos teste de campo aberto e de esquiiva inibitória (Mina et al., 2014). Utilizando o modelo animal de sepse, também foi observado que os níveis de citocinas (IL-6 e TNF- α podem ficar aumentados 30 e 60 dias respectivamente, após a indução da sepse, no líquor dos animais, conforme o estudo de Steckert e colaboradores (2013). Esses achados sugerem que além do dano oxidativo, as alterações nos níveis das citocinas produzidas periféricamente em resposta a uma infecção podem agir sobre o cérebro, principalmente em sintomas comportamentais relacionados à sepse (Dantzer et al., 2008).

A ativação do sistema imunológico durante o curso clínico da sepse está associada com mudanças fisiológicas e comportamentais que são importantes para a homeostase e sobrevivência (Capuron et al., 2011; Shivasharan et al., 2013). Os vários estressores podem afetar diretamente as células do sistema imunológico e modular a liberação de citocinas inflamatórias (Maes et al., 2012). Assim, neste estudo, o ECM protegeu o cérebro (hipocampo e córtex frontal) do aumento inicialmente esperado dos níveis das citocinas pró-inflamatórias - que é visto na sepse -, sugerindo que este é um dos mecanismos que explicam o efeito protetor do ECM sobre o comportamento depressivo observado no grupo ECM+CLP.

Além disso, o estresse pode ter produzido a ativação de vários sistemas fisiológicos, incluindo o eixo HPA, SNA e o imune, sendo que a magnitude desta resposta fisiológica ao estresse pode gerar uma adaptação fisiológica do organismo (Davidson e Echeverry 2011; Liu et al., 2016). Adicionalmente, tomando o exemplo do pré-condicionamento isquêmico, onde os astrócitos pré-condicionados produzem fatores

tróficos e anti-inflamatórios que contribuem para a neuroproteção (Pablos et al., 2006), o pré-condicionamento poderia ser alcançado usando um pré-tratamento de LPS em um modelo de isquemia cerebral (Wang et al., 2015). A partir dessa analogia, é possível que ECM possa preparar os animais para lidar com estresse adicional que, neste estudo, foi a sepse.

Algumas limitações devem ser apontadas neste estudo. Em primeiro lugar, não é possível determinar se qualquer estresse crônico pode exercer efeito protetor para um estresse sistêmico agudo como a sepse. Ou se há um efeito "dependente da dose", onde o estresse crônico pode ser adaptativo. Em segundo lugar, necessita-se de uma maior exploração das vias inflamatórias para melhor entender as possíveis interações moleculares entre ECM e a sepse.

6 CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo sugerem que um estresse anterior causado pela indução da ECM pode diminuir a inflamação cerebral e ao comportamento depressivo de longo prazo induzido pela sepse grave. Porém, mais estudos são necessários para compreender essa resposta gerada pelo ECM na sepse.

REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996; 383:787-93.
- Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*. 2007; 35:2408-16.
- Andel R, Crowe M, Kareholt I, Wastesson J, Parker MG. Indicators of job strain at midlife and cognitive functioning in advanced old age. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*. 2011; 66: 287-291.
- Angus DC, Van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840-851.
- Angus DC, Musthafa AA, Clermont G, Griffin MF, Linde-Zwirble WT, Dremsizov TT, Pinsky MR. Quality-adjusted survival in the first year after the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163:1389-1394.
- Bagot RC, Labonté B, Peña CJ, Nestler EJ. Epigenetic signaling in psychiatric disorders: stress and depression. *Dialogues Clin Neurosci*. 2014; 16(3):281-295.
- Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 2006; 34:886-9.
- Barichello T, Machado RA, Constantino L, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho F, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit Care Med*. 2007;35:2186-90.
- Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Long-term cognitive impairment in sepsis survivors. *Crit Care Med*. 2005; 33:1671.
- Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 2005; 33:221-3.

Berridge KC, Aldridge JW, Houchard KR, Zhuang X. Sequential superstereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyperdopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC Biology*. 2005; 3(4).

Bian Y, Pan Z, Hou Z, Huang C, Li W, Zhao B. Learning, memory, and glial cell changes following recovery from chronic unpredictable stress. *Brain Res.Bull*. 2012; 88(5): 471–476.

Biff D, Petronilho F, Constantino L, Vuolo F, Zamora-Berridi G, Dall'Igna D, Comim C, Quevedo J, Kapczinski F, Dal-Pizzol F. Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. *Crit care Shock*. 2013; 40 (1):45–48

Bolton CF. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: neuromuscular manifestations. *Crit Care Med*. 1996; 24: 1408-1416.

Borges S, Coimbra B, Soares-Cunha C, Miguel Pêgo J, Sousa N and João Rodrigues A. Dopaminergic modulation of affective and social deficits induced by prenatal glucocorticoid exposure. *Neuropsychopharm*. 2013; 38: 2068-2079.

Boufleur N, Antoniazzi CT, Pase CS, Benvegnú DM, Dias VT, Segat HJ, Roversi K, Roversi K, Nora MD, Koakoskia G, Rosa JG, Barcellos LJ, Bürger ME. Neonatal handling prevents anxiety-like symptoms in rats exposed to chronic mild stress: Behavioral and oxidative parameters. *Stress*. 2013; 16(3):321-330

Bozza FA, D'Avila JC, Ritter C, Sonnevile R, Sharshar T, Dal-Pizzol F. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. *Crit Care Shock*. 2013; 1:10-16.

Burton MD, Sparkman NL, Johnson RW. Inhibition of interleukin-6 trans-signaling in the brain facilitates recovery from lipopolysaccharide-induced sickness behavior. *J. Neuroinflam*. 2011; 8:54.

Capuron L, Miller AH. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol. Therap.* 201; 130:226–238.

Cauvi DM, Song D, Vazquez DE, Hawisher D, Bermudez JA, Williams MR, Bickler S, Coimbra R, De Maio A. A period of irreversible therapeutic intervention during sepsis correlates with a phase of innate immune dysfunction. *J Biol Chem.* 2012; 287(24):19804-15.

Charlton BG. The malaise theory of depression: major depressive disorder is sickness behavior and antidepressants are analgesic. *Med. Hypotheses Res.* 2000; 54(1):126–130.

Cheng Y, Pardo M, Armini RS, Martinez A, Mouhsine H, Zagury JF, Jope RS, Beurel E. Stress-induced neuroinflammation is mediated by GSK3-dependent TLR4 signaling that promotes susceptibility to depression-like behavior. *Brain Behav Immun.* 2011; 53, 207-222.

Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis and immune-mediated inflammation. *New England Journal of Medicine.* 1995; 332:1351-1362.

Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Rezin GT, Scaini G, Daufembach JF, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res.* 2011; 36(2):304-11.

Comim CM, Rezin GT, Scaini G, Di-Pietro PB, Cardoso MR, Petronilho FC, Ritter C, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Mitochondrion.* 2008; 8:313-8.

Comim CM, Pereira JG, Steckert A, Petronilho F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Rivastigmine reverses memory impairment observed in sepsis survivor rats. *Crit care Shock.* 2009; 32(3):270-71.

Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LC, Petronilho F, Constantino LS, Stertz L, Kapczinski F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F.

Depressive-like parameters in sepsis survivor rats. *Neurotox Res.* 2010; 17(3):279-86.

Dal-Pizzol F, Rojas H, Santos EM, Vuolo F, Constantino L, Feier G, Pasquali M, Comim C, Petronilho F, Gelain D, Quevedo J, Moreira JC, Ritter C. Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis. *Mol. Neurobiol.* 2013; 48 (1): 62–70.

Dantzer R, O'Connor JC, Lawson MA, Kelley KW. Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology.* 2011; 36(3):426–436.

Dantzer R. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2009; 29(2): 247-264.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2008; 9:46–56.

Dantzer R, Kelley KW. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav. Immun.* 2003; 21: 153–160.

Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2001; 933:222–234.

Davidson MB, Echeverry D. Collaborative care for depression and chronic illnesses. *N Engl J Med.* 2011; 364:1278-1279.

D'Avila JC, Santiago AP, Amâncio RT, Galina A, Oliveira MF, Bozza FA. Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Critical Care Med.* 2008; 36:1925-32.

Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity.* 2014; 40(4):463-475.

Di Donato S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis.* 2000; 23:247-63.

Dinarello CA. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res.* 2004; 10:201–222.

Dowing JEG, Miyan JA. Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunology Today.* 2000; 21:281-289.

Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol. Psychiatry.* 2010; 67(5): 446–457.

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

Ducottet C, Griebel G, Belzung C. Effects of the selective nonpeptide corticotrophin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003; 27:625–31.

Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J. Surg. Res.* 1990; 49:186–196.

Fonseca FCA, Coelho RZ, Nicolato R, Malloy-Diniz LF, Filho HCS. A influência de fatores emocionais sobre a hipertensão arterial. *J.B. de Psiquiatria* 58(2): 128-134, 2009

Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R, Dalmaz C. Effects stress on feeding behavior and on monoamine levels in structures. *Neurochem. Int.* 2003; 42: 107–114.

Garcia LSB, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Stertz L, Kapczinski F, Gavioli EC, Quevedo, J. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. *Biol. Psychiatry.* 2009; 33:450–455.

Gordon SM, Jackson JC, Ely EW, Burger C, Hopkins RO. Clinical identification of cognitive impairment in ICU survivors: insights for intensivists. *Intensive Care Med.* 2004; 30:1997-2008.

Hennessy MB, Deak T, Schiml PA. Sociality and sickness: have cytokines evolved to serve social functions beyond times of pathogen exposure?. *Brain Behav. Immun.* 2014; 37:0 15–20.

Hopkins RO, Jackson JC. Long-term Neurocognitive Function After Critical Illness. *Chest.* 2005; 130:869–878.

Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(12):862-874.

Howell MD, Talmor D, Schuetz P, Hunziker S, Jones AE, Shapiro NI. Proof of principle: the predisposition, infection, response, organ failure sepsis staging system. *Crit Care Med.* 2011; 39(2): 322–7.

Hubacek JA, Stüber F, Fröhlich D, Book M, Wetegrove S, Ritter M, et al. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med.* 2001; 29(3):557-61.

Isingrini E, Camus V, Guisquet AM, Pingaud M, Devers S, Belzung C. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: A model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS One.* 2010; 5:104-08.

Iwashyna TJ, Cooke CR, Wunsch H, Kahn JM. Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in older Americans. *J Am Geriatr Soc.* 2012;60(6):1070-77.

Jackson JC, Gordon SM, Ely EW, Burger C, Hopkins RO. Research issues in the evaluation of cognitive impairment in intensive care unit survivors. *Intensive Care Med.* 2004; 30:2009-16.

Jahng JW, Houtp TA. MK801 increases feeding and decreases drinking in nondeprived, freely feeding rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001; 68:181–6.

Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 1981; 5:247-251.

Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Animal models and human depressive disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 1981; 5:231–246.

Klauke B, Deckert J, Reif A, Pauli P, Domschke K. Life events in panic disorder - an update on “candidate stressors”. *Depress Anxiety.* 2010; 27: 716-730.

Komorowska J, Pisula W. Does Changing Levels of Stress Affect the Characteristics of Grooming Behavior in Rats? *Int J Comp Psychol.* 2013; 16, 237-246.

Korten NCM, Sliwinski MJ, Comijs HC, Smyth JM. Mediators of the relationship between life events and memory functioning in a community sample of adults: life events, memory functioning, and possible mediators. *Appl Cogn Psychol.* 2014; 28: 626-633.

Lawson MA, Parrott JM, McCusker RH, Dantzer R, Kelley KW, O'Connor JC. Intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide induces indoleamine-2,3-dioxygenase-dependent depression-like behaviors. *J. Neuroinflam.* 2013; 10: 87.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464-78.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994; 233:346–357.

Li S, Wang C, Wang W, Dong H, Hou P, Tang Y. Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. *Life Sci.* 2008; 82:934–942.

Liang X, Yan NH, Si Wei C, Wen JW, Xu N, Cui S, Liu XH, Zhang H, Yue NL, Liu S, Yang M, Dong Y. Antidepressant-like effect of asiaticoside in mice. *pharmacol biochem behav.* 2008;89(3):444-9.

Licinio J, Wong M. Interleukin 1 receptor antagonist gene expression in rat pituitary in the systemic inflammatory response syndrome: pathophysiological implications. *Mol Psychiatry.* 1997; 2:99–103.

Liu D, Wang Z, Gao Z, Xie K, Zhang Q, Jiang H, Pang Q. Effects of curcumin on learning and memory deficits, BDNF, and ERK protein expression in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Behav. Brain Res.* 2014; 271:116–121.

Liu S, Li T, Liu H, Wang X, Bo S, Xie Y, Bai X, Wu L, Wang Z, Liu D. Resveratrol exerts antidepressant properties in the chronic unpredictable mild stress model through the regulation of oxidative stress and mTOR pathway in the rat hippocampus and prefrontal cortex. *Behav. Brain Res.* 2016; 302:191-199.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-7.

Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Reus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Gavioli EC. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int.* 2009; 54:358–362.

Madrigal JL, Garcia-Bueno B, Caso JR, Pérez-Nievas BG, Leza JC. Stress induced oxidative changes in brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets Methods Enzymol.* 2006; 5(5):561–568.

Maes M, Berk M, Goehler L, Song C, Anderson G, Leonard B. Depression and sickness behaviour are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC Med.* 2012; 10:66.

Maes M, Kubera M, Obuchowiczwa E, Goehler ., Brzeszcz J. Depression's multiple comorbidities explained by (neuro)inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. *Neuro Endocrinol.* 2011; 32(1):7–24.

Manoli LP, Gamaro GD, Silveira PP, Damaz C. Effect of chronic variate stress on thiobarbituric-acid reactive species and on total radical-trapping potential in distinct regions of rat brain. *Neurochem Res.* 2000; 25(7): 915–921.

Marcondes FK, Vanderlei LCM, Lanza LLB, Spadari-Bratfisch RC. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996; 74(6): 663-669.

Maxime V, Siami S, Annane D. Metabolism modulators in sepsis: the abnormal pituitary response. *Crit Care Med.* 2007; 35:596-601.

Mcewen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 2000; 886 (2):172-189.

Melinder C, Udumyan R, Hiyoshi A, Brummer RJ, Montgomery S. Decreased stress resilience in young men significantly increases the risk of subsequent peptic ulcer disease - a prospective study of 233 093 men in Sweden. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015; 41(10): 1005-1015.

Messarisi E, Memos N, Chatzigianni E, Konstadoulakis MM, Menenakos E, Katsaragakis S, Voumvourakis C, Androulakis G. Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death. *Crit Care Med.* 2004; 8:1764-1770.

Michels M, Danieslki LG, Vieira A, Florentino D, Dall'Igna D, Galant L, Sonai B, Vuolo F, Mina F, Pescador B, Dominguni D, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Petronilho F. CD40-CD40 ligand pathway is a major component of acute neuroinflammation and contributes to long-term cognitive dysfunction after sepsis. *Mol. Med.* 2015; 21:219-226.

Nestler EJ, Gould E, Manji H, Buncan M, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky I, Zalcman S. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry.* 2002; 52:503-528.

Osborne, P., Mataga, N., Onoe, H., & Watanabe, Y. (1993). Behavioral activation by stimulation of a GABAergic mechanism in the preoptic area of rat. *Neuroscience Letters*, 158(2), 201-204.

Oviedo-Boyso J, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM. Collaborative action of toll-like and nod-like receptors as modulators of the inflammatory response to pathogenic bacteria. *J Interferon Cytokine Mediat Res.* 2014; 2014:432785.

Pablos RM, Villaran RF, Arguelles S, Herrera AJ, Venero JL, Ayala A, Cano J, Machado A. Stress increases vulnerability to inflammation in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci.* 2006; 26: 5709–5719.

Papadopoulos MC, Davies DC; Moss RF, Tighe D; Bennett E. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med.* 2000; 35:596-601.

Parker KJ, Schatzberg AF and Lyons DM. Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Horm Behav.* 2003;43:60-66.

Piato AL, Detanico BC, Jesus JF, Lhullier F, Nunes DS, Elisabetsky E. Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: Further indication of antidepressant properties. *J Ethnopharmacol.* 2008; 2 (23): 300–4.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977; 21:266–730.

Rudiger A, Stotz M, Singer M. Cellular processes in sepsis. *Swiss Med Wkly.* 2008; 138:629-634.

Sah SP, Tirkey N, Kuhad A, Chopra K. Effect of quercetin on lipopolysaccharide induced-sickness behavior and oxidative stress in rats. *Indian J Pharmacol.* 2011; 2:192–196.

Sales JJAL, David CM, Hatum R, Souza PC, Japiassú A, Pinheiro CT. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileiras. *Rev. bras. ter. intensiva.* 2006; 1:9-17

Schulz D, Buddenberg T, Huston J. Extinction-induced “despair” in the water maze, exploratory behavior and fear: Effects of chronic antidepressant treatment. *Neurobiology of Learning and Memory.* 2007; 87:624-634.

Schwalm MT, Pasquali M, Miguel SP, Dos Santos JP, Vuolo F, Comim CM, Petronilho F, Quevedo J, Gelain DP, Moreira JC, Ritter C, Dal-Pizzol F. Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. *Mol Neurobiol.* 2014;49(1):380–385.

Scragg P, Jones A, Fauvel N. Psychological problems following ICU treatment. *Anaesthesia.* 2001; 1:9-14.

Semmler A, Hermann S, Mormann F, Weberpals M, Paxian SA, Okulla T, Schäfers M, Kummer MP, Klockgether T, Heneka MT. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *J Neuroinflammation*. 2008; 5:38-48.

Sharshar T, Annane D, Grandmaison G de la, Brouland JP, Hopkinson NS, Gray F. The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol*. 2004; 14:21-33.

Sharshar T, Gray F, Lorin de la Grandmaison G, Hopkinson NS, Ross E, Dorandeu A, Orlikowski D, Raphael J-C, Gajdos P, Annane D. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet*. 2003; 362:1799-1805.

Shindo Y, McDonough JS, Chang KC, Ramachandra M, Sasikumar PG, Hotchkiss RS. Anti-PD-L1 peptide improves survival in sepsis. *Journal of Surgical Research*. 2017; 208:33-39.

Shivasharan BD, Nagakannan P, Thippeswamy BS, Veerapur VP. Protective effect of *Calendula officinalis* L. flowers against monosodium glutamate induced oxidative stress and excitotoxic brain damage in rats. *Ind J Clin Biochem*. 2013; 28:292-298.

Silva E, Pedro MA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, Sousa EF, Abe TP, Andrade J, Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E. Brazilian sepsis epidemiological study (bases study). *Crit care med*. 2004; 4:251-260.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, Van der Poll T, Vincent J, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-810.

Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*. 2004;364(9433):545-548.

Spruijt B, van Hooff J, & Gispen W. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological Reviews*. 1992; 72(3):825-852.

Steckert AV, Comim CM, Mina F, Mendonça BP, Domingui D, Ferreira GK, Carvalho-Silva M, Vieira JS, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Late brain alterations in sepsis-survivor rats. *Synapse*. 2013; 11:786-793.

Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C. Drug dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol.Psychiatry*. 2008;64:293-301.

Szentirmai E, Krueger JM. Sickness behaviour after lipopolysaccharide treatment in ghrelin deficient mice. *Brain Behav.Imm*. 2014; 36:200–206.

Takala A, Nupponen I, Kylänpää-Bäck ML, Repo H. Markers of inflammation in sepsis. *Ann of med*. 2002; 34:614-23.

Tanno AP, Bianchi FJ, Moura MJCS, Marcondes FK. Atrial supersensitivity to noradrenaline in stressed female rats. *Life Sci*. 2002;71(25):2973-81.

Tasaki K, Ruetzler CA, Ohtsuki T, Martin D, Nawashiro H, Hallenbeck, JM. Lipopolysaccharide pretreatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res*. 1997; 748:267-270.

Tomasi CD, Vuolo F, Generoso J, Soares M, Barichello T, Quevedo J, Ritter C, Dal-Pizzol F. Biomarkers of delirium in a low-risk community-acquired pneumonia-induced sepsis. *J Neurol Neurobiol*. 2016; 1-5.

Tracey KJ. Understanding immunity requires more than immunology. *Nature Immunology*. 2010;11:561–564.

Treese BR, Ritter RC, Burns GA. Lesions of the dorsal vagal complex abolish increases in meal size induced by NMDA receptor blockade. *Brain Res*. 2008;72:37

Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Med.* 2008; 34:1724-1731.

Vandijck D, Decruyenaere JM, Blot SI. The value of sepsis definitions in daily ICU-practic. *Acta Clin Belg.* 2006; 5:220-226.

Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, De Paris F, Furman M, De Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn mem.* 2000; 7:333-40.

Vincent JL. Update on sepsis: pathophysiology and treatment. *ActaClin Belg.* 2000; 2:79-87.

Vollmayr B, Henn FA. Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. *Neurosci and Biobehavi Rev.* 2005; 29: 799-804.

Vollmayr B, Henn FA. Stress models of depression. *Clin.Neurosci.Res.* 2003; 3:245–251.

Wang Y, Reis C, Applegate R, Stier G, Martin R, Zhang JH. Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: Applications pre-peror post-stroke. *Exp neurol.* 2005; 272:26-40.

Weiberg MS, Bhatt AP, Girotti M, Masini CV, Day HE, Campeau S and Spencer RL. Repeated ferret odor exposure induces different temporal patterns of same-stressor habituation and novel-stressor sensitization in both hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and forebrain c-fos expression in the rat. *Endocrinol.* 2009; 150:749-761.

Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence.* 2014; 5(1):36-44.

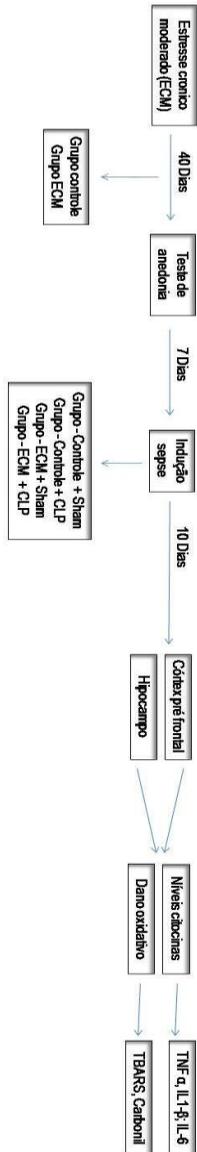
Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioral–neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology.* 2005; 52:90–110.

Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav.Immun.* 2011; 2:181–213.

Zhang D, Wen XS, Wang XY, Shi M, Zhao Y. Antidepressant effect of Shudihuang on mice exposed to unpredictable chronic mild stress. *J Ethnopharmacol.* 2009; 123:55–60.

APÊNDICE

APÊNDICE A – DESENHO EXPERIMENTAL



APÊNDICE B – PROTOCOLO PARA A INDUÇÃO DO ECM

Dias do tratamento	Estressor usado	Duração	Horário do dia
Dia 1	Privação de água	24 h	8:00 a.m.
Dia 2	Privação de comida	24 h	8:00 a.m.
Dia 3	Luz estroboscópica	3 h	1:00 p.m.
Dia 4	Contenção + frio	2 h	9:00 a.m.
Dia 5	Isolamento	24 h	8:00 a.m.
Dia 6	Isolamento	24 h	8:00 a.m.
Dia 7	Isolamento	24 h	8:00 a.m.
Dia 8	Privação de comida	24 h	8:00 a.m.
Dia 9	Contenção	2 h	1:00 p.m.
Dia 10	Isolamento	24 h	8:00 a.m.
Dia 11	Isolamento	24 h	8:00 a.m.
Dia 12	Isolamento	24 h	8:00 a.m.
Dia 13	Sem estressores	-	-
Dia 14	Sem estressores	-	-
Dia 15	Privação de comida	24 h	8:00 a.m.
Dia 16	Luz estroboscópica	3 h	1:00 p.m.
Dia 17	Privação de água	24 h	8:00 a.m.
Dia 18	Privação de comida	24 h	8:00 a.m.
Dia 19	Luz estroboscópica	3 h	9:00 a.m.
Dia 20	Contenção + frio	2 h	1:00 p.m.
Dia 21	Luz estroboscópica	3 h	2:00 p.m.
Dia 22	Privação de água	24 h	8:00 a.m.
Dia 23	Contenção	2 h	8:00 a.m.
Dia 24	Contenção + frio	2 h	1:00 p.m.
Dia 25	Privação de comida	24 h	8:00 a.m.
Dia 26	Luz estroboscópica	3 h	2:00 p.m.
Dia 27	Isolamento	24 h	8:00 a.m.
Dia 28	Isolamento	24 h	8:00 a.m.
Dia 29	Sem estressores	-	-
Dia 30	Privação de comida	24 h	8:00 a.m.
Dia 31	Contenção	2 h	3:00 p.m.
Dia 32	Contenção + frio	2 h	9:00 a.m.
Dia 33	Luz estroboscópica	3 h	1:00 p.m.
Dia 34	Isolamento	24 h	8:00 a.m.
Dia 35	Isolamento	24 h	8:00 a.m.
Dia 36	Privação de água	24 h	8:00 a.m.
Dia 37	Privação de comida	24 h	8:00 a.m.
Dia 38	Sem estressores	-	-
Dia 39	Luz estroboscópica	3 h	8:00 a.m.
Dia 40	Contenção	2 h	2:00 p.m.

ANEXO

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 001/2015-1

Professor responsável: Felipe Dal Pizzol

Equipe: Amanda Valnier Steckert, Monique Michels, Diogo Domingui, Bruna Pescador Mendonça, Tatiana Barichello, João Luciano de Quevedo

Título: O impacto do estresse crônico sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em ratos submetidos à sepse.

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 72 Ratos Wistar machos de 50 dias e pesando aproximadamente 250g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 001/2015-1

Principal Investigator: Felipe Dal Pizzol

Researchers: Amanda Valnier Steckert, Monique Michels, Diogo Domingui, Bruna Pescador Mendonça, Tatiana Barichello, João Luciano de Quevedo

Project title: The impact of chronic stress on behavioral and neurochemical parameters in rats subjected to sepsis.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 10 de março de 2015.


JAIRO JOSÉ ZOCHE
Coordenador da CEUA

ANEXO B – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O impacto do estresse crônico sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em ratos submetidos à sepse.", registrada com o protocolo nº 049/2016-2, sob a responsabilidade de Felipe Dal Pizzol, junto à equipe: Amanda Valnier Steckert, Monique Michels, Diogo Domingui, Bruna Pescador Mendonça, Tatiana Barichello, João Luciano de Quevedo - que envolve a produção, manutenção ou utilização de 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 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 da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 18/10/2016.

Finalidade	(X) Ensino () Pesquisa Científica
Vigência da autorização	31/10/2016 a 01/02/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo Wistar
Nº de animais	44
Idade/Peso	60 Dias
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "The impact of chronic stress on behavioral and neurochemical parameters in rats subjected to sepsis."

Protocol number: 049/2016-2

Principal Investigator: Felipe Dal Pizzol

Researchers: Amanda Valnier Steckert, Monique Michels, Diogo Domingui, Bruna Pescador Mendonça, Tatiana Barichello, João Luciano de Quevedo.

The project was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 18 de outubro de 2016.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA