

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA**

Hidrogênio molecular inibe a resposta inflamatória e previne o dano cognitivo em ratos submetidos ao choque séptico

Aline Alves de Jesus

- RIBEIRÃO PRETO-

2018

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA**

Hidrogênio molecular inibe a resposta inflamatória e previne o dano cognitivo em ratos submetidos ao choque séptico

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Aline Alves de Jesus

Orientadora: Prof^a. Dra. Evelin Capellari Cárnio

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTETRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Jesus, Aline Alves de

Hidrogênio molecular inibe a resposta inflamatória e previne o dano cognitivo em ratos submetidos ao choque séptico.

Ribeirão Preto-SP-2018.

80p.:fig

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP- Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Cárnio, Evelin Capellari

1. Choque Séptico 2. Hidrogênio molecular 3. Mediadores inflamatórios.

Nome: Jesus, Aline Alves de

Título: Hidrogênio Molecular inibe a resposta inflamatória e previne o dano cognitivo em ratos submetidos ao choque séptico.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a): _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A minha mãe Valdeci, que sempre foi e sempre será meu maior incentivo, grande inspiração da minha vida, o meu exemplo de força e humildade, a quem devo tudo o que sou e por ser uma luz que sempre guiará o meu caminho.

A minha tia Doraci, que sempre me ajudou nos momentos mais difíceis e a quem tenho como exemplo de vida.

Ao meu irmão Diego, pelo apoio e momentos compartilhados.

Aos meus primos/irmãos Grazielle, Vanessa, Wallace e Danilo que sempre fizeram parte da minha trajetória e com quem compartilhei momentos e experiências.

Agradecimentos

À minha orientadora Prof^a. Dra. Evelin Capellari Cárnio por ter me proporcionado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa durante esses dois anos, pelos ensinamentos, confiança, gentileza, respeito e humildade que me fez admirá-la como pessoa e profissional.

A Mestre e colega de laboratório Patrícia Passaglia por todos os momentos compartilhados durante a realização deste mestrado, pela amizade, conversas, ensinamentos e colaboração para a realização do meu projeto.

Ao Mestre Marcelo Batalhão, por ter auxiliado na realização dos experimentos. Pela dosagem de nitrato das minhas amostras, pelas conversas e pela amizade.

Aos Mestres e colegas de laboratório Felipe Faim e André Luiz pela amizade.

À Prof^a. Dra. Angelita Stabile, pela colaboração na realização do *western immunoblotting*.

Ao Prof. Dr. João Pereira Leite, por ceder seu laboratório e aparatos para realização dos testes comportamentais.

À Claudia, Elisa e Fernando, pela simpatia e excelente assistência administrativa da secretaria de departamento de Fisiologia.

À técnica Nadir Fernandes, por me ensinar a cirurgia de indução da sepse experimental.

Aos meus velhos amigos de Guarulhos e aos que conheci em Ribeirão Preto, que sempre me deram apoio e sempre se fizeram presente na minha trajetória acadêmica. Em especial a Jéssica Benevides, Ana Claudia, Aline Meira, Jociele Cristina, Sara Ornella, Keyla Ornella, Tatiane Borges, Daniele Maria, Thais Rezende, Karen Santos, Gabriela Bragagnollo, André Silva, Isabelle Rodrigues, Gabriela Borges, Eduardo Saramago e Bruna Maitan.

Aos queridos amigos Eliane Pereira, José Ângelo, Samanta Rangel e João Rangel por me acolherem durante os seis meses de intercâmbio na Espanha, pela amizade e momentos incríveis compartilhados.

À Prof^a. Dra Ana Maria Briones Alonso pela oportunidade de estagiar em seu laboratório durante o intercâmbio, pelo acolhimento e os ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

À Prof^a. Dra. Beatriz Rossetti Ferreira com quem iniciei minha trajetória na pesquisa, pelos ensinamentos e por ser um exemplo de profissional a seguir.

A todos os meus familiares que me apoiam e torcem por mim.

Ao CNPq (**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos o muito obrigado!!

“Os momentos mais esplendidos da vida não os chamados dias de êxito, mas sim, aqueles dias em que, saindo do desânimo e desespero, sentimos erguer-se dentro de nós um desafio: a vida e a promessa de futuras realizações”.

Gustave Flaubert

Resumo

JESUS, A. A. 2018. 80f. Hidrogênio Molecular inibe a resposta inflamatória e previne o dano cognitivo em ratos submetidos ao choque séptico, 2018. 80f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2018.

O sistema nervoso central (SNC) é uma das primeiras regiões a ser acometida durante a sepse e choque séptico, o que contribui para o aumento da taxa de morbidade e mortalidade. Pacientes em choque séptico apresentam disfunção neuronal aguda, tais como o delírio, desorientação e coma. Em longo prazo, o dano cognitivo pode ocorrer ocasionando o comprometimento do aprendizado e formação de memória. Estudos demonstram que durante a resposta inflamatória sistêmica exacerbada, mediadores inflamatórios presentes na circulação sistêmica, são capazes de chegar ao SNC e ocasionar a ativação de células gliais, conduzindo a um estado de neuroinflamação. Nesse processo, algumas estruturas do SNC, tais como o hipocampo são mais vulneráveis à ação de espécies reativas de oxigênio (ERO), e a mediadores inflamatórios produzidos de forma excessiva durante a sepse. Neste contexto, a investigação de novas estratégias terapêuticas que sejam capazes de atenuar a resposta inflamatória exacerbada se faz necessário. Assim, o presente projeto teve como objetivo investigar prováveis propriedades antioxidante e anti-inflamatória do Hidrogênio molecular (H_2), bem como sua possível ação neuroprotetora em ratos submetidos à sepse polimicrobiana, induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP). Para isso o projeto foi dividido em dois protocolos experimentais. No primeiro protocolo ratos *Wistar* submetidos à cirurgia de CLP ou Sham, foram submetidos ao tratamento com inalação do H_2 a 2%, por um período de 1h durante 10 dias consecutivos, e logo após foram submetidos a testes comportamentais para avaliação da memória de habituação, discriminativa e aversiva. No segundo protocolo os animais foram tratados com inalação do H_2 por um período de 3h, e 24h após ao término da cirurgia de CLP/Sham foram decapitados para coleta do sangue e cérebro. A partir dos resultados dos testes comportamentais observamos que o tratamento com inalação do H_2 durante a sepse experimental preveniu a perda de memória e o dano cognitivo, bem como foi capaz de diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias de fase aguda tais como IL-1 β , IL-6 e TNF α no córtex pré-frontal e hipocampo. A estratégia também foi capaz de diminuir os níveis de TBARS no plasma. Observamos um aumento da concentração da enzima catalase nos animais tratados com H_2 . Em conjunto os resultados indicam que o H_2 foi capaz de inibir a resposta inflamatória e prevenir o dano cognitivo, agindo como uma substância neuroprotetora em ratos submetidos ao choque séptico experimental.

ABSTRACT

JESUS, A. A. 2018. 80f. **Molecular hydrogen inhibits inflammatory response and prevents cognitive damage in rats submitted to septic shock**, 2018. 80f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2018.

The central nervous system is one of the first regions to be affected during Sepsis and septic shock, which contributes to the increased rate of morbidity and mortality. Patients with severe sepsis may present acute neuronal dysfunction such as delirium, disorientation, and unconscious. In the long term, cognitive damage can occur causing the commitment of learning and memory formation. Studies show that during the exacerbated systemic inflammatory response, inflammatory mediators present in the systemic circulation, are able to reach the CNS and cause the activation of glial cells, leading to a state of neuroinflammation. In this process, some CNS structures such as the hippocampus are more vulnerable to the action of reactive oxygen species (ROS), and to inflammatory mediators produced excessively during sepsis. In this context, the investigation of new therapeutic strategies that are capable of attenuating the exacerbated inflammatory response is necessary. Thus, the present project aimed to investigate the probable antioxidant and anti-inflammatory properties of molecular hydrogen (H₂), as well as its possible neuroprotective action in rats submitted to polymicrobial sepsis induced by ligature and cecal puncture (CLP). In order to check this hypothesis, the project was divided into two experimental protocols. In the first protocol *Wistar* rats submitted to CLP or Sham surgery were submitted to 2% H₂ inhalation treatment for a period of 1h for 10 consecutive days, and soon after they underwent behavioral tests to evaluate habituation memory, discriminative and aversive. In the second protocol the animals were treated with H₂ inhalation for a period of 3h and 24h, and at the end of the treatment, they were decapitated for blood and brain collection. Plasma was already used for nitrate dosage, lipid peroxidation, antioxidant enzymes and inflammatory cytokines. From the results of the behavioral tests, we observed that treatment with H₂ inhalation during the experimental sepsis prevented memory loss and cognitive damage, and was able to decrease the levels of acute-phase inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL -6 and TNF α in the prefrontal cortex and hippocampus. The therapeutic strategy was also able to decrease plasma TBARS levels. We also observed an increase in the concentration of the enzyme catalase in H₂-treated animals. Together the results indicate that molecular hydrogen was able to inhibit the inflammatory response and prevent cognitive damage, acting as a neuroprotective substance, in rats submitted to experimental septic shock.

Sumário

1. Introdução	18
OBJETIVOS	25
Geral.....	26
Específicos	26
MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.2 Tratamento com hidrogênio molecular	28
4. Desenho experimental.....	28
4.1 Cirurgia:	28
4.2 Grupos experimentais	29
4.3 Sobrevida	29
4.4 Avaliação comportamental	29
4.5 Campo Aberto.....	29
4.6 Reconhecimento de objetos	31
4.7 Medo Condicionado ao Contexto	32
5. Técnicas	34
5.1 Coleta de tecido cerebral.....	34
5.2. Dosagem de Nitrato/Nitrito (NOx).....	34
5.4 Determinação dos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias (ELISA).....	34
5.4.1 Dosagem de IL-6, TNF- α e IL-1 β	34
5.5. Dosagem de TBARS.....	35
5.6. Dosagem da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD).....	35
5.7. Dosagem da enzima antioxidante Catalase (CAT).....	35
6. Protocolos experimentais	36
Protocolo 1.....	36
Protocolo 2.....	37
6.1 Verificar o efeito da administração do H ₂ sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias, IL-6, TNF- α e IL-1 β , induzida por CLP.....	37

6.2	Verificar o efeito da administração de H ₂ sobre a concentração plasmática nitrato.....	38
6.3	Verificar o efeito da administração de H ₂ sobre o estresse oxidativo no plasma de	38
8.	Resultados.....	40
8.1	Avaliação da taxa de sobrevivência durante os sete primeiros dias após a cirurgia de CLP/Sham.....	40
8.2	Avaliação da memória e cognição por meio de testes comportamentais.....	41
8.2.1	Avaliação da memória de habituação por meio do teste campo aberto (<i>Open Field</i>)..	41
8.2.2	Avaliação da memória a curto e em longo prazo através do teste de reconhecimento de objetos.....	41
8.2.3	Avaliação da memória aversiva através do teste do medo condicionado ao contexto.	44
9.0	Determinação do efeito do H ₂ a 2% sobre a concentração plasmática de citocinas inflamatórias.	45
9.1.	Determinação do efeito do H ₂ a 2% sobre a concentração plasmática de TBARS.	46
9.2	Determinação do efeito do H ₂ a 2% sobre a concentração plasmática de enzimas antioxidantes.	47
9.3.	Determinação do efeito do H ₂ a 2% sobre a concentração plasmática de nitrato	49
9.4.	Determinação do efeito do H ₂ a 2% sobre a concentração de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória no Hipocampo e córtex pré-frontal	49
9.5.	Determinação do efeito do H ₂ a 2% sobre a concentração de nitrato no córtex e Hipocampo.....	51
10.	Discussão	54
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
AP	Área postrema
BHE	Barreira Hematoencefálica
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLP	<i>Cecal ligation and puncture</i> ou ligadura e punção cecal
CBP	Co-ativador transcricional
CVO s	Órgãos circunventriculares
DNA-	Ácido desoxirribonucleico
EaNC	Estímulo aversivo não condicionado
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
ERs	Espécies reativas
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HO-1	Heme oxigenase
IL	Interleucina
iNOS	Sintase da óxido nítrico isoforma induzida
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LTA	Ácido lipoteicóico
min	Minuto (s)
n	Número de animais
NF-κB	Fator nuclear κB
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase

NOSi NOS induzida

NOx Nitrito e nitrato

NQO1 quinona dehidrogenase

Nrf2 Nuclear factor erythroid 2

NTS Núcleo do trato solitario

OVLT Órgão vascular da lamina terminal

O₂•⁻ Ânion superóxido

OH•⁻ Radical hidroxil

ONOO⁻ Peroxinitrito

PAPC 1-palmitoil-2-araquidonil-sn-glicerol-3-fosforicolina

PGPC 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicerol-3-fosforicolina

PRx- Peroxiredoxina

POVPC- 1-palmitoil-2(5-oxovaleroil)-sn-glicerol-3-fosforicolina

PVN Núcleo paraventricular

KeP1 Kelch-like ECH-associated Protein 1

REC Resposta emocional condicionada

SNC Sistema nervoso central

SOD Superóxido dismutase

TBARS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TLR Receptor Toll-like

TNF- α Fator de necrose tumoral alfa

Trx- Tioredoxina

Lista de Figuras

Figura 1: Representação dos possíveis mecanismos antioxidantes exercido pelo hidrogênio molecular	22
Fig 2. Hipótese do projeto	24
Figura 3. Protocolo experimental do teste Campo aberto (Open Field) destacando as fases de habituação e treino ao qual os animais foram submetido	30
Figura 3.1 Representação do Aparato e software utilizados no teste do campo aberto (open field).	30
Figura 3.2 Representação da caixa utilizada para a realização do teste Reconhecimento de Objeto	32
Figura 3.3. Protocolo experimental do teste de reconhecimento de Objeto	32
Figura 3.4. Representação do Aparato utilizado para a realização do teste de Condicionamento contextual	33
Figura 3.5. Protocolo experimental para a realização do teste comportamental Medo Condicionado ao Contexto	34
Figura 4. Figura explicativa da escala de tempo do protocolo experimental 1	37
Figura 4.1 Figura explicativa da escala de tempo do protocolo experimental 2	37
Figura 5. Taxa de sobrevivência dos animais durante os sete primeiros dias após a cirurgia de CLP/Sham.	40
Figura 6. Avaliação do tratamento com H ₂ a 2% na memória de habituação	41
Figura 6.1 – Avaliação do tratamento com H ₂ a 2% em ratos submetidos ao choque séptico sobre a memória discriminativa.....	43
Figura 6.2. Avaliação do tratamento com H ₂ a 2%, em ratos submetidos ao choque sobre a memória aversiva.....	45
Figura 7. Determinação dos níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias de fase aguda em animais sépticos.....	46
Figura 7.1. Determinação dos níveis plasmáticos das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	47
Figura 7.2. Determinação dos níveis plasmáticos das enzimas antioxidantes SOD, catalase e da capacidade antioxidante.....	48

Figura 7.3. Efeito do H ₂ a 2% nas concentrações plasmáticas de nitrato de ratos em choque sépticos.	49
Figura 7.4. Determinação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias.....	51
Figura 8.0. Representação do mecanismo molecular do H ₂	63
Figura 8.1. Representação de um possível mecanismo de ação do H ₂	64

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A sepse é definida como uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada que acomete um grande número de pacientes em Unidades de Terapia Intensiva sendo acompanhada por uma alta taxa de morbidade e mortalidade. Nos últimos 60 anos o número de casos vem aumentando de forma considerável, ocorrendo anualmente cerca de 18 milhões de casos no mundo. (NIEDERMAN *et al.*, 1990; RANGEL-FRAUSTO, 2005).

O cérebro é um dos primeiros órgãos a ser afetado durante a sepse levando a uma disfunção aguda tais como o delírio, desorientação e coma. Em longo prazo pode ocorrer dano cognitivo com comprometimento da memória e processo de aprendizagem (Zhou, 2012). Estudos têm evidenciado que a resposta inflamatória exacerbada com alta produção de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio (ERO), contribuem para o dano de células neuronais, destruição da barreira hematoencefálica (BHE) e consequente apoptose celular, que por sua vez, está envolvida na fisiopatologia que ocasiona alterações cognitivas em pacientes sépticos (DAL-PIZZOL *et al.*, 2010 e FLIERL *et al.*, 2010).

Na literatura científica, alguns modelos animais são utilizados para reproduzir as alterações observadas no desenvolvimento da sepse, tais como o modelo de injúria com liberação da flora bacteriana, considerado o que mais se assemelha ao quadro de sepse em humanos. Nesse modelo, após a realização da perfuração da parede intestinal, ocorre uma liberação gradativa de conteúdo cólico para a cavidade peritoneal, que pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (BROOKS *et al.*, 2007).

Quando na presença do agente infeccioso, ocorre um aumento da ativação de células imunológicas, bem como excessiva liberação de citocinas pró-inflamatórias. (YU *et al.*, 1997). Os fatores desencadeantes da resposta sistêmica mediada por ativação celular, são principalmente os componentes presentes na parede celular dos microorganismos, tais como o lipopolissacarídeo (LPS), presente em bactérias Gram-negativas, (endotoxinas) o ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicanos originados de bactérias Gram-positivas, (exotoxinas). (HALLMAN *et al.*, 2001; OPAL, 2007). A resposta imunológica frente à presença de um patógeno é mediada inicialmente por neutrófilos, monócitos e macrófagos que expressam os receptores do tipo *Toll-like* (TLR), capazes de reconhecer padrões moleculares presentes em uma variedade de microorganismos (WEIGAND, 2004). De tal maneira, diversos estudos indicam os possíveis mecanismos que levam ao comprometimento neuronal devido a uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada, como a que ocorre na sepse e choque séptico. E dentre os

mecanismos propostos, encontra-se a ativação de células imunológicas residentes no sistema nervoso central (SNC).

O cérebro contém células gliais também conhecidas como neuroglia que incluem os astrócitos, micróglia e oligodendrócitos, (LIU et al,2011). A micróglia que são macrófagos que também compõem a população de células do SNC, correspondem a cerca de 12% das células neuronais e encontram-se normalmente em estado de repouso, monitorando continuamente a área onde residem à procura de possíveis agentes infecciosos e mudanças no seu microambiente, podendo tornarem-se ativas em distúrbios patológicos que comprometam o SNC (STREIT et al. 2005; SHATZ, 2009).

Os receptores do tipo *Toll-like* de células gliais ao serem ativadas através da ação do LPS ou ácido lipoteicóico (LTA), acionam várias proteínas citoplasmáticas acessórias que convergem para a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), onde dentre suas ações está o controle da expressão de genes das citocinas pró-inflamatórias agudas tais como TNF α , IL-1 β e IL-6, (LUHESHI, 1998). Por sua vez, essas citocinas que também podem ser produzidas a nível periférico, parecem exercer efeitos direto ou indireto sobre o SNC. De forma indireta, atuam por meio dos órgãos circumventriculares (CVOs) que são desprovidos da barreira hematoencefalica (BHE) e que localizam-se próximas a outras estruturas cerebrais (BLATTEIS et al., 1987; STITT, 1990).

Em relação a via direta o acometimento da neuroinflamação pode ocorrer por meio da BHE que tem sua estrutura comprometida na sepse, devido a fatores como a ativação de vias de transcrição de enzimas, como a forma induzível da óxido nítrico síntase (iNOS) e elevada concentração de óxido nítrico (NO), que desempenham ações pró-inflamatórias contribuindo para a disfunção das células endoteliais vasculares cerebrais, aumentando sua permeabilidade (TACCONI et al, 2010). Além disso, as células que compõem a BHE possuem receptores para citocinas podendo tornar-se responsivas a essas moléculas imunologicamente ativas (BANKS, 2015). Com o seu comprometimento, mediadores produzidos sistemicamente podem exercer efeitos diretos sobre SNC, conduzindo a ativação de células microgliais (TACCONI et al, 2010). Semmler et al, utilizando o modelo experimental de indução da sepse via injeção do LPS em ratos, demonstraram que a resposta inflamatória periférica leva a uma alta ativação de células gliais no SNC e que a neuroinflamação conduz a apoptose de células neuronais em diferentes regiões por meio da ação de mediadores inflamatórios (SEMMLER et al, 2005). Em condições fisiopatológicas, como na sepse também ocorre produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas células neuronais que contribuem para o dano celular (FREDERICKSON, 1992).

As ERO são formadas por processos metabólicos a partir da redução do oxigênio (O_2) em superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxil (HO^\cdot) respectivamente. Estes agentes oxidantes contribuem de forma significativa para a apoptose dos neurônios por meio direto, através de sua ação peroxidativa sobre as membranas das células neuronais; modificação na estrutura de proteínas ocasionando sua fragmentação, ligação cruzada e agregação, tornando-as alvos de proteases intracelulares; e dano no DNA mitocondrial ou nuclear. De forma indireta, contribuem para a morte celular por serem capazes de levar a ativação de células gliais e a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (BEAL, 1996; DEVLIN, 2011).

O peróxido de hidrogênio é considerado a ERO mais abundante e o principal mediador do estresse oxidativo visto que, por mais que se apresente quimicamente estável pode desencadear citotoxicidade de forma indireta ao ser reduzido a radical hidroxil (OH^\cdot) que por sua vez, apresenta alta toxicidade e reatividade. (BEAL, 1996). As ERO são produzidas por variados sistemas celulares tais como por meio da ativação da NADPH oxidase, presentes na membrana plasmática de células fagocíticas; enzimas do citocromo P450, óxido nítrico sintase (NOS), xantina oxidase e do metabolismo mitocondrial, considerado uma das principais vias de formação de espécies reativas (ERs). As mitocôndrias também são capazes de produzir óxido nítrico (NO) e outras espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo um dos principais o peroxinitrito ($ONOO^-$) sintetizado a partir da reação do NO com O_2 (BEAL, 1996, GHAFOURIFAR, 2005; BAYIR 2008). Sharshar e colegas constataram que a apoptose neuronal do centro de controle autonômico em pacientes que foram a óbito em consequência de choque séptico estava associada à elevada ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela formação de NO e pelo aumento da atividade microglial e de astrócitos. (SHARSHAR, 2003, SHARSHAR, 2005).

O cérebro normalmente é exposto à ação de ERO devido a sua alta taxa metabólica e algumas das suas regiões parecem ser mais vulneráveis do que outras. O hipocampo, por exemplo, conhecido como importante estrutura cerebral responsável pelo processo de aprendizagem e formação de memória, parece ser mais sensível à presença de ERO (SCHULTZ et al 2002). Esta estrutura também expressa alta quantidade de receptores para citocinas pró-inflamatória, tornando-se alvo desses agentes químicos que estão relacionados com o desencadeamento do dano cognitivo (CALABRESI et al., 2013 e ROTHWELL e HOPKINS, 1995.; Rocha et al, 2016.; Ilker et al, 2010). Pesquisas evidenciam que o comprometimento desta estrutura está diretamente associado ao declínio cognitivo, tais como o déficit de memória

viso-espacial e condições patológicas como a depressão (ROCCA et al, 20015., LONGONO et al, 2015).

Devido ao seu auto efeito tóxico a produção das ERs é regulada por mecanismos fisiológicos antioxidantes que possibilitam compensar sua formação minimizando seus efeitos lesivos sobre as células. Entretanto, em situações em que há aumento da produção de ERs como a que ocorre na sepse e choque séptico, há um desequilíbrio em seu sistema regulatório resultando em aumento de sua síntese e diminuição da formação de moléculas antioxidantes, conduzindo ao estresse oxidativo (SIES 1997; APEL & HIRT 2004).

Os mecanismos de proteção antioxidante podem ser de origem não enzimática, correspondente à primeira linha de defesa; e de natureza enzimática, tendo como principal molécula antioxidante a enzima superóxido dismutase (SOD), responsável em catalisar a conversão de superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que possui baixo efeito oxidativo; a catalase, glutatona peroxidase (GPx) as peroxiredoxinas (Prx), as tioredoxinas (Trx) e a glutatona redutase, que catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio a água (KAMATA & HIRATA 1999). Essas enzimas antioxidantes são formadas a partir da ativação do sistema Nrf2/Keap1, que induz a expressão gênica para a codificação de proteínas com potencial efeito antioxidante. (SHIBATA et al 2008, WANG et al 2008). Este sistema encontra-se acoplado e inativo no citoplasma e é sensível a alteração da concentração de H_2O_2 , que ao ter seus níveis aumentados conduz a sua ativação (PURDOM-DICKINSON et al. 2007).

Após ocorrer o desacoplamento da proteína Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2*) de KeP1 (*Kelch-like ECH-associated Protein 1*) no citoplasma das células, está se torna livre para migrar até o núcleo onde desempenha sua função na expressão gênica. Entretanto, algumas situações fisiopatológicas podem comprometer a produção de antioxidantes. Na literatura encontra-se descrito que a subunidade p65 do fator de transcrição Nf- κ B, quando se encontra na sua forma ativa compete com a proteína Nrf2 por um sítio de ligação ao Co-ativador transcricional CBP que facilita a ligação dos fatores ao *DNA*, inibindo assim a regulação da expressão gênica via Nrf2 (LIU et al. 2008). O que poderia explicar a diminuição da formação de componentes antioxidantes na sepse e choque séptico onde há um aumento da estimulação do fator NF- κ B.

Estudos mostram que a ativação de Nrf2 pode ser induzido por uma variedade de compostos naturais e sintéticos e que a sua ativação pode contribuir de forma significativa em distúrbios oxidativos (KOBAYASHI *et al.* 2009). Dessa forma a utilização de antioxidantes pode ter efeito benéfico em situações de sepse podendo diminuir o acometimento do SNC vulnerável ao estresse oxidativos e inflamação exacerbada.

Neste contexto, pesquisas nos últimos anos vêm sendo realizadas com hidrogênio molecular (H_2) mostrando que este gás apresenta importante efeito antioxidante. O H_2 é considerado uma das menores e mais abundante molécula química encontrada no universo que também parece exercer relevante efeito anti-inflamatório e anti-apoptótico. (ZHENG et al 2016).

Dole *et al*, foi um dos pioneiros a relatar que este gás poderia exercer ação antioxidante a partir da reação exotérmica combinando-se com o radical hidroxil, resultando na formação de água (DOLE *et al*, 1975). Em 2007, o pesquisador Ohsawa e colaboradores, trabalhando com cultura de células da linhagem THP-1, expostas ao estresse oxidativo induzido por antimicina, constataram que o H_2 foi capaz de prevenir o dano oxidativo nas células ao interagir e reduzir os níveis do radical hidroxil (OH) e peroxidonitrito (ONOO), (OHSAWA *et al*, 2007). Ainda, XIE e Shih et al, em seus estudos também mostraram que a inalação do gás em ratos sépticos promoveu a expressão de Nrf2 em órgãos como o coração e o pulmão, sugerindo que sua ação antioxidante também pode ser resultante da ativação desse fator de transcrição nuclear responsável pela expressão de enzimas antioxidantes. (XIE, 2014; SHIH *et al* 2003).

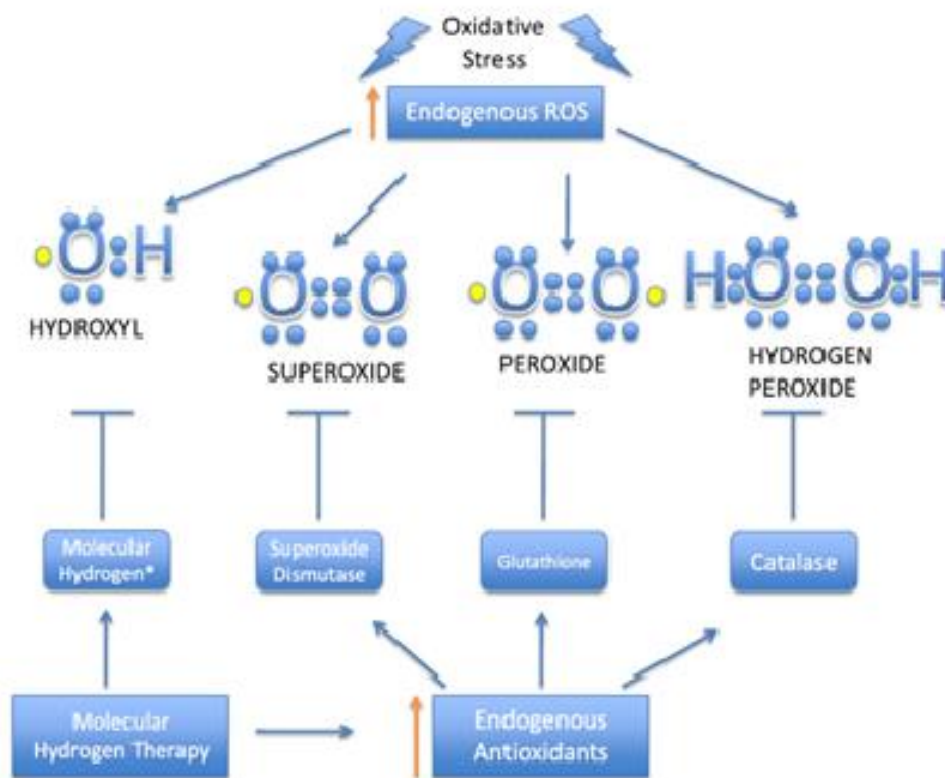


Figura 1: Representação dos possíveis mecanismos antioxidantes exercido pelo hidrogênio molecular (BRANDON, 2013).

O H₂ possui propriedades que o difere de outros agentes antioxidantes visto que, por ser uma pequena molécula na natureza possui a capacidade de atravessar a membrana celular, alcançar organelas tais como a mitocôndria e até mesmo chegar ao núcleo (OHSAWA *et al*, 2007). Como anteriormente descrito, também parece possuir efeito anti-apoptótico; CAI *et al* propôs que essa ação ocorre devido ao fato do H₂ suprimir a ação de ERO que age sobre vias que conduzem a ativação de caspase-3 levando a apoptose celular (CAI *et al* 2008). ZHOU *et al*, também demonstraram em um modelo experimental de indução de pancreatite aguda em cultura de células pancreáticas (AR42J), que após a exposição ao H₂ houve uma diminuição nos níveis de citocinas pró- inflamatórias tais como TNF α , IL-1 β e IL-6, e bem como aumento nos níveis séricos de citocinas anti-inflamatória como a IL-10, demonstrando que este gás pode exercer ação anti-inflamatória (ZHOU *et al*, 2016).

Assim, o conjunto de dados demonstra que além de exercer ações antioxidantes relevantes o gás H₂ também pode contribuir para diminuir os efeitos deletérios no organismo que ocorre devido a uma resposta inflamatória exacerbada, como a observada na sepse e choque séptico. Entretanto, poucos estudos até o momento avaliaram se este gás pode exercer efeito protetor sobre o SNC em situações de resposta inflamatória sistêmica, como a que é ocasionada pelo modelo experimental do CLP, uma vez que, sua propriedade física permite sua difusão através da BHE

Portanto, a hipótese deste projeto é que o tratamento a partir da inalação do H₂ em ratos sépticos contribua para prevenir o dano cognitivo possibilitando aumentar a sobrevivência dos animais, devido a suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-apoptótica, atenuando o estresse oxidativo, as citocinas pró-inflamatórias, e a síntese de NO resultante da indução da sepse pelo modelo de *ligadura e perfuração cecal* (CLP).

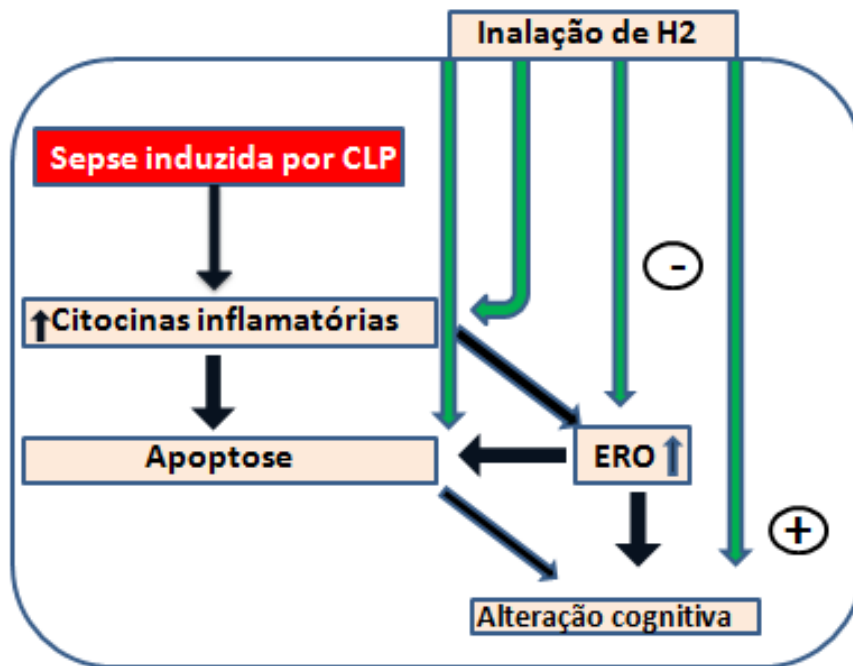


Fig 2. Hipótese do projeto: A inalação de H₂ irá prevenir o dano cognitivo possibilitando aumentar a sobrevivência dos animais, devido suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-apoptóticas, atenuando o estresse oxidativo, citocinas pró-inflamatórias e a síntese de NO, induzidas pelo modelo de *ligadura e perfuração cecal* (CLP).

OBJETIVOS

Objetivos

Geral: Investigar se o hidrogênio molecular (H_2) previne o dano cognitivo e a perda de memória agindo sobre a síntese de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10), óxido nítrico (NO) e peroxidação lipídica, produzidos durante o choque séptico induzido pelo modelo CLP.

Específicos:

- 2.1** Avaliar o efeito da administração de H_2 sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 e anti-inflamatória (IL-10) no soro, hipocampo e cortex pré-frontal.
- 2.2** Avaliar o efeito da administração do H_2 sobre a concentração de nitrato no plasma, hipocampo e córtex pré-frontal em animais submetidos ao choque séptico.
- 2.3** Avaliar taxa de sobrevivência dos animais.
- 2.4** Avaliar o efeito da administração do H_2 na prevenção do dano cognitivo em animais sépticos.

Para alcançar tais objetivos propostos, o projeto foi dividido em dois protocolos experimentais. O primeiro teve como objetivo investigar o efeito do H_2 sobre a perda de memória e alteração cognitiva, no modelo de inflamação sistêmica, por meio de três testes comportamentais, bem como analisar a taxa de sobrevivência dos animais durante sete dias. Neste protocolo após 24h da cirurgia CLP ou Sham, ratos *Wistar* foram tratados com inalação do gás por um período de 1h durante 10 dias consecutivos, e logo após o término do tratamento foram submetidos aos testes comportamentais para avaliação da memória de habituação, discriminativa e aversiva como detalhado em materiais e métodos a seguir.

O segundo protocolo teve como objetivo investigar o efeito do H_2 sobre a síntese de citocinas pró-inflamatória, óxido nítrico e peroxidação lipídica. Neste protocolo os animais após 24h da cirurgia de CLP/Sham, foram decapitados para coleta do sangue e cérebro. O hipocampo e o córtex pré-frontal foram extraídos para quantificação de citocinas inflamatórias, por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) Já o sangue foi utilizado para dosagem de nitrato, citocinas, enzimas antioxidantes e TBASRS como abordado a seguir.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* adultos, com peso médio entre 250-300g, provenientes do Biotério Central do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas plásticas coletivas (3-4 animais por caixa) acondicionadas em estante ventilada (Alesco Ind. E Comércio Ltda, Monte Mor, SP, Brasil), em ambiente com temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), sob ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração comercial balanceada até o dia do experimento e o projeto foi aprovado pelo comitê de ética local (CEUA nº. 2016.5.96.22.3).

3.2 Tratamento com hidrogênio molecular

Após 24 h de recuperação da cirurgia de CLP e Sham, os animais pertencentes ao protocolo 1 foram colocados isoladamente em uma caixa vedada ao fluxo de ar ambiente, sendo administrado um fluxo contínuo do H_2 a 2%, O_2 21% e N 77% a 4L/min durante uma hora. Já os animais do protocolo 2, foram expostos a inalação do H_2 uma hora após a cirurgia do CLP/Sham por um período de três horas consecutivas. Tais recipientes utilizados para o tratamento foram aprovados e padronizados pelo Comitê de Ética local e a escolha da concentração do gás foi baseada em estudos anteriores que comprovaram que o método a ser utilizado não induz a nenhum dano ou intoxicação ao animal, e ao mesmo tempo produzem os efeitos desejados. (Xie et al., 2012) As caixas utilizadas possuem pequenos furos por onde são conectadas extensões de plástico que conduz a mistura gasosa para dentro do recipiente, sendo a mesma regulada por um fluxômetro; bem como possui extensões que conduzem a saída do gás para o ambiente externo do laboratório sendo dissipado. Já os animais controles também foram submetidos a uma mesma condição que os animais CLP. Os ratos foram colocados em caixas vedadas onde ocorria a entrada e saída de ar ambiente gerado por meio de bombas de água. A todo o momento os animais foram mantidos à temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e receberam água e alimento durante o tratamento.

4. Desenho experimental

4.1 Cirurgia:

Modelo CLP

Para realização da cirurgia por ligadura e perfuração cecal (CLP) os ratos foram anestesiados com uma solução anestésica de Ketamina 10% (15mg/Kg) e xilazina 2% (7,5mg/Kg) por via intraperitoneal. Após a realização da tricotomia na região abdominal, os animais foram colocados em mesa cirurgica e após realização de assepsia do local com álcool iodado, foram submetidos a uma laparotomia com incisão longitudinal de aproximadamente 1cm com exposição do ceco, pelo qual foi semi-ocluido com fio seda na região próxima a valvula íleocecal. Por sua vez, o ceco recebeu uma unica perfuração com uma agulha estéril de calibre 18G; logo após foi levemente comprimido para extravazamento de conteúdo fecal através do local de punção. Em seguida o ceco foi recolocado na cavidade peritoneal e realizou-se sutura com fio seda 6-0 estéril.

Os animais pertencentes ao grupo Sham ar e Sham + H₂ foram submetidos ao processo cirurgico similar entretanto, sem ligadura e perfuração cecal. Todos os animais receberam rehidratação com solução fisiológica (1ml/Kg), por via subcutânea, para reposição de fluido após a cirurgia de CLP/Sham.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (10 animais por grupo) sendo eles: 1) Grupo Sham ar; 2) Grupo Sham H₂; 3) Grupo CLP ar; 4) Grupo CLP H₂;

4.3 Sobrevida

Os animais foram monitorados após a cirurgia CLP/Sham para avaliação de taxa de sobrevivência durante os sete primeiros dias após a cirurgia.

4.4 Avaliação comportamental

Os ratos foram submetidos a três tarefas para avaliação comportamental após CLP ou Sham: Campo aberto, renhecimento de objetos e teste de condicionamento do medo contextual como descritas a seguir:

4.5 Campo Aberto (Open Field): Nesta tarefa avaliou-se o desempenho motor na seção treino e a memória de retenção não associativa na sessão teste. A habituação ao campo aberto foi realizada em uma arena de acrílico (46 x 46 x 46 cm) cercada por sensores infravermelhos, responsáveis pela detecção da posição do animal durante todo o período de monitoramento. Assim, foi possível realizar o cálculo da taxa de velocidade média e da distância total percorrida, durante todo experimento por meio de um *software* (Insight, Brasil). Adicionalmente ao registro da atividade locomotora realizado pelos sensores, registrou-se a

atividade exploratória por câmeras digitais. Os animais foram colocados no centro da arena para explorá-la por 5 minutos (sessão treino) e, após 24 horas, foram novamente submetidos a uma sessão de campo aberto semelhante (sessão teste). A distância total percorrida e os levantamentos (*rearings*) em ambas as sessões foram contados. A diminuição da distância total percorrida e do número de levantamentos entre as duas sessões foi utilizada como medida da retenção de habituação (Vianna et al 2000).

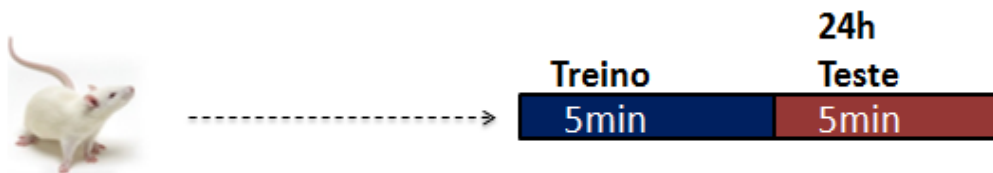


Figura 3.0 Protocolo experimental do teste Campo aberto (Open Field) destacando as fases de habituação e treino ao qual os animais foram submetidos.

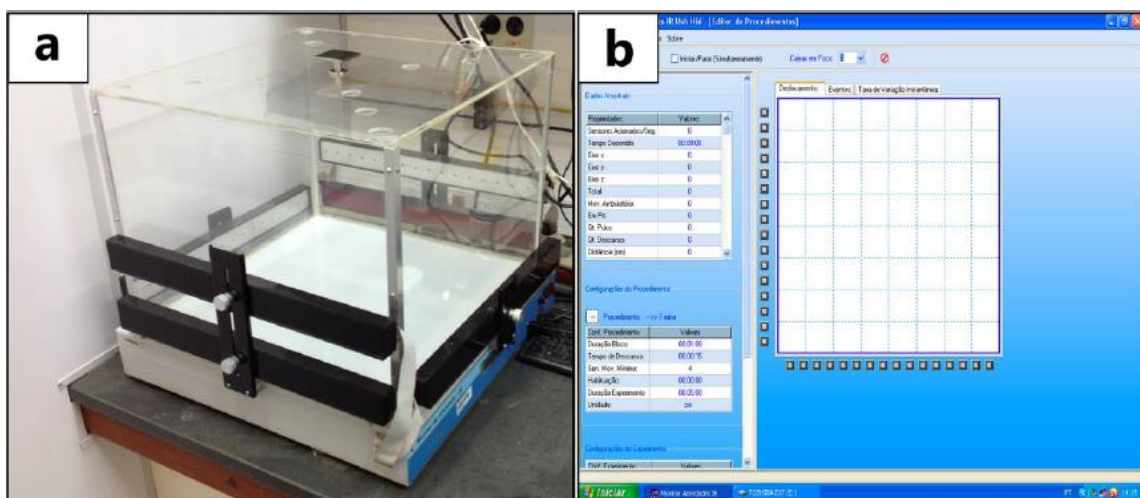


Figura 3.1 Representação do Aparato e software utilizados no teste do campo aberto (open field). Arena de acrílico equipada com sensores infravermelhos (a). Interface do programa de

computador utilizado para calcular a distância total percorrida e o número de *rearings* (levantamentos) realizados pelos animais (b).

4.6 Reconhecimento de objetos: Os testes foram realizados em uma caixa de madeira dividida em quatro quadrados iguais com fita adesiva. Os animais passaram por sessão de habituação na caixa na ausência de objetos e outros estímulos comportamentais durante 20 minutos. Os objetos a serem reconhecidos eram feitos de metal, vidro ou plástico e foram fixados no assoalho da caixa com fita. Na sessão de treino os animais foram colocados na arena na presença de dois objetos iguais (A e A'), e permanecem ali para explorá-los por 5 minutos. Na sessão de teste 1, realizada 20 min após o treino, um dos objetos foi substituído por um novo objeto (B) e o animal novamente foi colocado na arena para explorar o objeto por 5 minutos. 24h após ao primeiro teste o objeto B foi trocado por um outro elemento (Objeto C) explorando os mesmo durante 5min. A exploração dos objetos foi definida como o fato de cheirar ou tocar os objetos com o nariz e as patas anteriores. O tempo gasto explorando cada objeto foi registrado e expresso como o percentual do tempo total de exploração em segundos (Rossato et al, 2007).

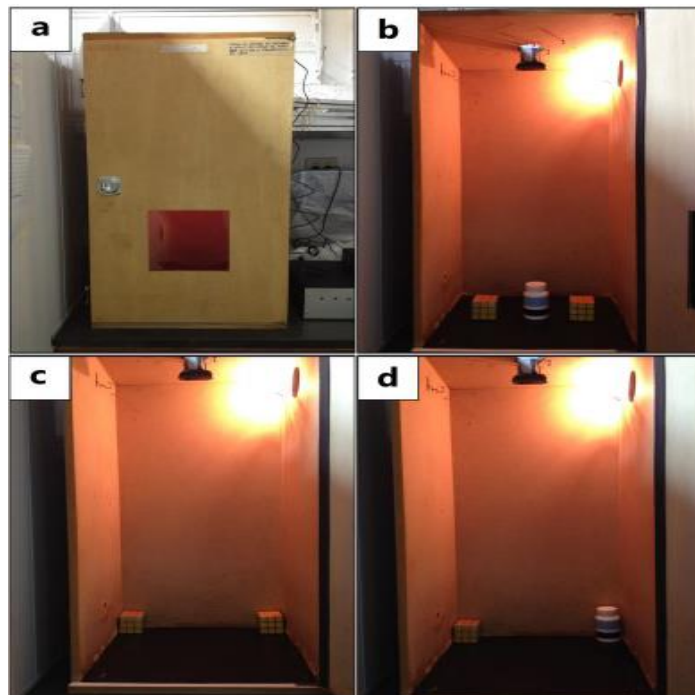


Figura 3.2 Representação da caixa utilizada para a realização do teste Reconhecimento de Objeto (a), Objetos utilizados durante o teste (b). Objetos iguais posicionados no canto esquerdo e direito (c), Objetos utilizados para avaliar a memória em curto prazo.

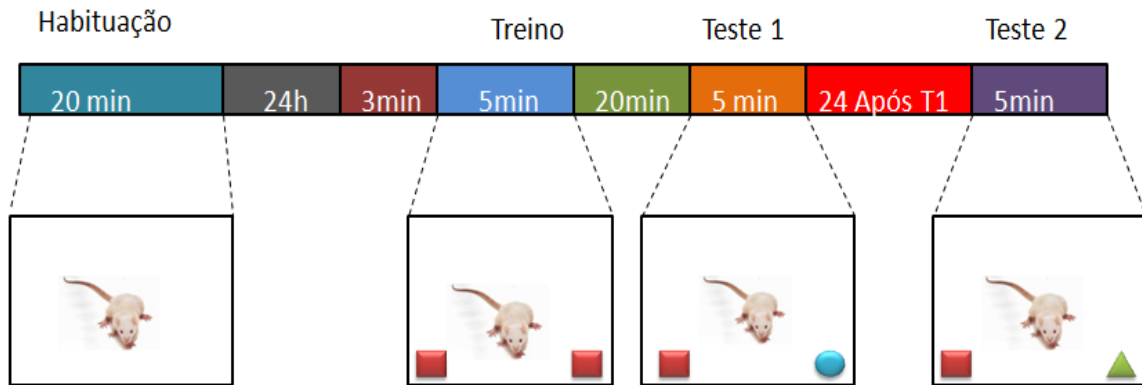


Figura 3.3. Protocolo experimental do teste de reconhecimento de Objeto. Para a realização deste teste os animais foram submetidos a sessões de habituação, treino, teste 1 e teste 2.

4.7 Medo Condicionado ao Contexto: O condicionamento dos animais ocorreu em uma câmara experimental, feita de acrílico, com 23 x 22,5 x 24 cm. O assoalho da câmara é composto por 18 barras de metal (2 mm de diâmetro), espaçadas por 1 cm e conectadas a um gerador de choque (*scrambler*, Insight, Brasil). O experimento foi dividido em duas sessões: a sessão de condicionamento e a sessão de teste

Sessão de condicionamento: nessa etapa os animais foram colocados no aparato e, após 5 minutos de habituação, receberam 10 choques nas patas. Os choques possuem intensidade de 0,8 mA, com duração de 1 segundo cada, sendo o intervalo entre eles de 1 minuto, totalizando assim aproximadamente 10 minutos de distribuição do estímulo aversivo incondicionado. O tempo total despendido nessa sessão foi de aproximadamente 15 minutos.

Sessão teste: Após 24 horas, os animais foram colocados novamente no aparato para evocação da memória aversiva. O tempo de congelamento foi registrado durante 10 minutos, sendo esse

Figura 3.5. Protocolo experimental para a realização do teste comportamental Medo Condicionado ao Contexto. Os animais foram habituados na câmara experimental por um período de 5 min. Em seguida, foram submetidos a uma série de dez ciclos compostos por um estímulo aversivo não condicionado (EaNC) - choque elétrico de 0.8 mA durante 1 s, e um intervalo de 60 s, no qual a taxa de congelamento foi analisada entre os intervalos na sessão do condicionamento. Após 24h os animais foram recolocados no mesmo aparato para avaliar a taxa de congelamento a cada minuto por um período de 10 min. E após 5 dias foram novamente colocados no aparato para avaliar a taxa de congelamento.

5. Técnicas

5.1 Coleta de tecido cerebral- Os animais foram decapitados 24h após a realização da cirurgia. O cérebro foi dissecado a fresco e congelado em gelo seco. Logo após foi armazenado a -80°C até a separação do hipocampo e Córtex pré-frontal que foram homogeneizados em solução tampão para posteriores dosagens.

5.2. Dosagem de Nitrato/Nitrito (NO_x)

Alíquotas de 50 µl da amostra do plasma e Córtex-Pré-frontal (homogeneizada em salina 0,9%) e do plasma foram desproteinizadas por precipitação utilizando 200 µl etanol absoluto mantido a 4°C, seguido de agitação e permaneceram por 30 minutos em freezer (-20°C), e em seguida, foram submetidas à centrifugação (4.000 g, 10 min, 25°C) para posterior dosagem. Utilizou-se a técnica de quimioluminescência NO/ozônio utilizando-se o analisador Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical Instruments, Boulder, CO. USA). O volume de 5 µl de amostra foi injetado na câmara de reação do analisador contendo o agente redutor 0,8% de cloreto de vanádio em 1N de HCl à 95°C (para determinação de nitrato) ou com o agente redutor 1% de NaI em ácido acético (para determinação de nitrito). O conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA). Os resultados foram normalizados pela concentração protéica de cada amostra e expressos como µg/ml.

5.4 Determinação dos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias (ELISA)

5.4.1 Dosagem de IL-6, TNF- α e IL-1 β

A determinação dos níveis plasmáticos e teciduais de IL-6, TNF- α e IL-1 β foram obtidas através do método de ELISA, seguindo recomendações dos kits (R&D Systems, Inc., códigos R6000B; RTA00; RLB00, respectivamente). O hipocampo e córtex pré-frontal foram homogeneizados em tampão fosfato com pH 7,4 (20 mmol/L de KH₂PO₄, 1 mmol/L de EGTA e 150 mmol/L de sacarose). O conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA). A absorbância foi lida no comprimento de onda de 450 nm e os resultados foram expressos em pg/mL (plasma) e pg/mL/mg proteína (tecido).

5.5. Dosagem de TBARS

A determinação plasmática das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foi realizada pelo método colorimétrico, seguindo recomendações do kit (TBARS Assay Kit, Cayman, código 10009055). O cálculo da concentração de TBARS foi feito por meio de uma curva padrão de bis-malonaldeído (MDA) e os resultados representados como nmol/mg de proteína.

5.6. Dosagem da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD)

A determinação dos níveis plasmáticos da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) foi realizada por meio do kit assay (Cayman, Ann Arbor, USA) seguindo as instruções do fabricante. Neste método foi utilizado o sal de tretrazólio para a detecção de radicais superóxidos gerados pela xantina oxidase e hipoxantina. A absorbância das amostras foi mensurada a 440 nm usando um leitor de placa de ELISA (Varian Cary 50 UV-Visible Spectrophotometer - Microplate reader - Model 50MPR). Os resultados foram expressos em unidades de SOD/mL onde, uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzimas necessárias para apresentar 50% da dismutação do radical superóxido (Para obtenção dos resultados em unidades de SOD foi necessário um fator de calibração construído a partir de uma curva-padrão com concentrações conhecidas da enzima, disponível no kit utilizado).

5.7. Dosagem da enzima antioxidante Catalase (CAT)

Para avaliar os níveis plasmáticos da enzima catalase (CAT) foi utilizado kit *CAT assay kit* (Cayman, Ann Arbor, USA) em que é utilizado a função peroxidática da CAT para determinação da atividade enzimática, isto é, a velocidade com que o H₂O₂ é reduzido pela ação desta enzima (Figura 4). Essa redução provoca uma diminuição no valor da absorbância das amostras verificada espectrofotometricamente a 540 nm (Varian Cary 50 UV-Visible Spectrophotometer - Microplate reader - Model 50MPR). Os resultados foram expressos em unidades de CAT, onde uma unidade

de CAT foi definida como a quantidade de enzimas necessárias para gerar 1,0 nmol de formaldeído (nmol/min/mL).

5.7.1. Análise da capacidade antioxidante

Para analisar a capacidade antioxidante do plasma dos animais foi utilizado o kit *Cayman's Antioxidant*, seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente este kit pode ser utilizado para mensurar a capacidade antioxidante total do plasma ou soro. Neste método não é possível separar os antioxidantes aquosos e lipídicos do plasma devido a atividade combinante de todos os constituintes presentes que incluem vitaminas, proteínas, lipídeos, glutatonas, ácido úrico e entre outros. O teste se baseia na formação do radical cátion ABTS^{•+} [2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfonato)], de coloração verde-azulada, e sua remoção (pelos constituintes da amostra, isto é, soro, medicamento ou alimento), medida por espectrofotometria. No TEAC, o ABTS é incubado com a enzima metahemoglobina peroxidase, produzindo o radical ABTS^{•+} (reações 1 e 2), que apresenta coloração azul-esverdeada estável, com leitura da absorbância a 600nm. ABTS^{•+} quando formado permite a diminuição na absorbância a 600 nm. A absorbância a 600 nm é inversamente associada com o conteúdo de antioxidante na amostra que é comparada com um padrão, o antioxidante Trolox um análogo hidrofílico à vitamina E (Figura 1). Os resultados são expressos em mmol de equivalentes de Trolox (ET)/L (sangue ou fluidos) ou em μ mol ET/100g de amostra (alimento ou amostra sólida)

6. Protocolos experimentais

Protocolo 1.

Objetivo: Investigar o efeito do H₂ sobre a perda de memória e alteração cognitiva, no modelo de inflamação sistêmica CLP.

Os animais pertencentes ao grupo CLP ar e CLP + H₂ foram submetidos à cirurgia por ligadura e perfuração como já previamente descrito. Já o grupo Sham ar e Sham+ H₂ foram submetidos à operação similar, entretanto sem ligadura e perfuração cecal. Após 24 horas de recuperação os grupos CLP + H₂ e Sham+ H₂ foram colocados nas caixas vedadas para receberem o tratamento com H₂ a 2% durante 60 minutos no decorrer de 10 dias. Realizou-se monitorização dos animais durante e após a cirurgia para registro de sobrevivência. Todos os sobreviventes passaram pelos três testes comportamentais descritos no item 4.3 após 10 dias após a realização da cirurgia.

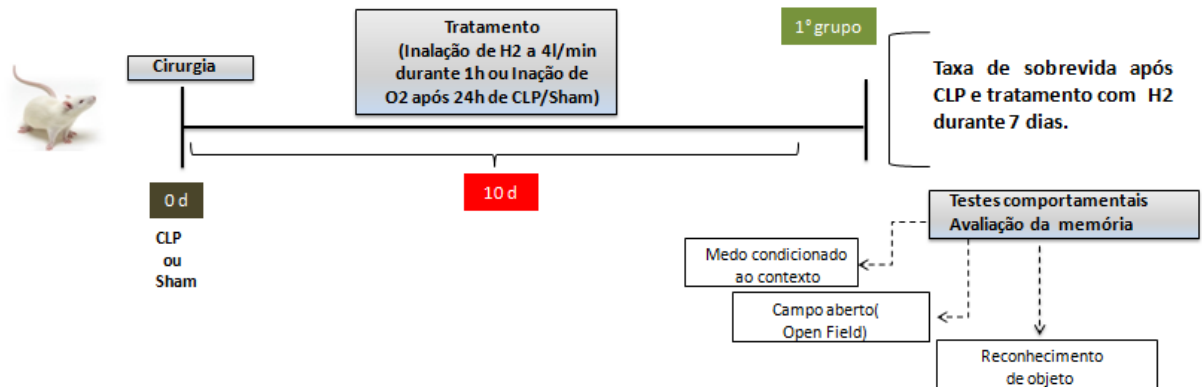


Figura 4. Figura explicativa da escala de tempo do protocolo experimental 1.

Protocolo 2.

Objetivo: Investigar o efeito do H₂ sobre a síntese de citocinas pró-inflamatória e anti-inflamatória, nitrato, TBARS e enzimas antioxidantes induzidos pelo modelo CLP.

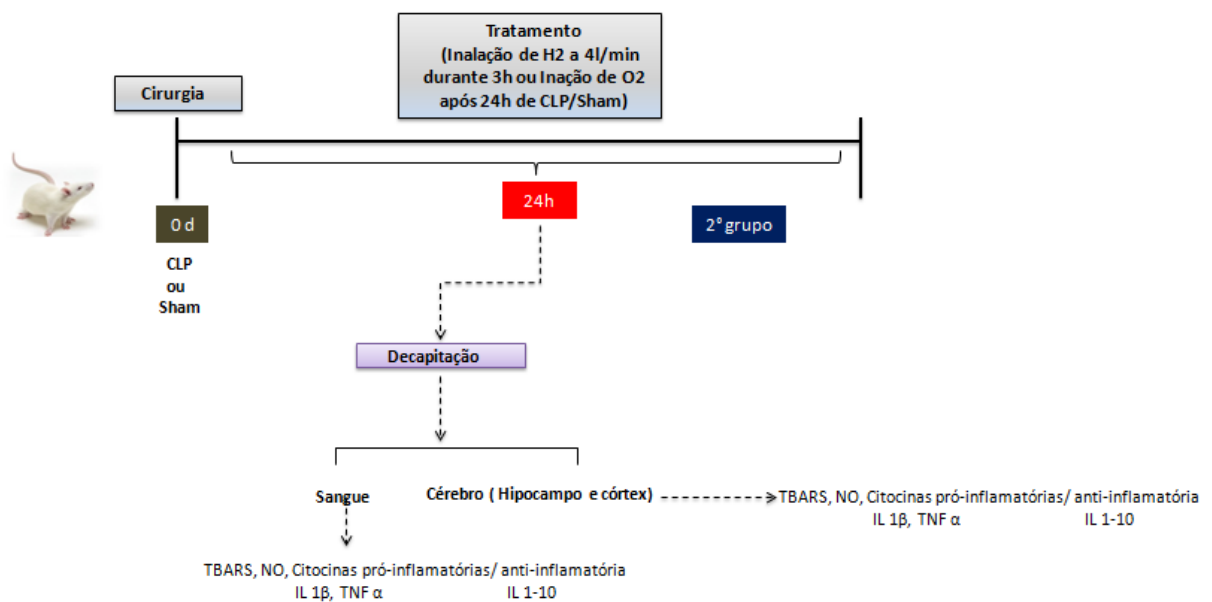


Figura 4.1 Figura explicativa da escala de tempo do protocolo experimental 2.

6.1 Verificar o efeito da administração do H₂ sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias, IL-6, TNF- α e IL-1 β , induzida por CLP.

Para verificar o efeito do H₂ sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias, IL-6, TNF- α e IL-1 β e anti-inflamatória IL-10, os animais foram tratados conforme o esquema

demonstrado na figura 3 deste projeto; após 24h da cirurgia foram decapitados, e o sangue, hipocampo e córtex coletados. O soro, córtex pré-frontal e hipocampo foram utilizados para a análise da concentração de IL-6, TNF- α e IL-1 β através dos métodos de Elisa correspondentes, anteriormente descritos nos itens 5.4 e 5.5.

6.2 Verificar o efeito da administração de H₂ sobre a concentração plasmática e tissular do hipocampo de nitrato em animais submetidos ao choque séptico induzido pelo modelo CLP.

Para esta avaliação os animais foram tratados como descrito no item 3.2, decapitados para coleta de sangue do tronco e tecido cerebral. O plasma coletado e processado (já descrito) foi utilizado para análise da concentração plasmática de nitrato pelo método de quimiluminescência, por aferição indireta de Nitrato, utilizando-se um analisador Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical Instruments, Bolder, CO. USA).

6.3 Verificar o efeito da administração de H₂ sobre o estresse oxidativo no plasma de animais submetidos ao choque séptico induzido por CLP.

Para investigar o efeito do H₂ sobre o estresse oxidativo foi realizado a quantificação de TBARS no plasma dos animais como especificado no item 5.5 bem como também foi investigado o efeito do gás sobre concentração de catalase e capacidade antioxidante utilizando os respectivos kits *CAT assay* (Cayman, Ann Arbor, USA) e *Cayman's Antioxidant*.

7. Análise estatística

Os valores obtidos foram expressos como média \pm SEM. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas através do programa *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software, Inc. 2007*). As variáveis foram submetidas à análise paramétrica utilizando os testes estatísticos: Teste t-pareado e Mann-Whitney; One-way ANOVA (análise de variância de via única) seguida do pós-teste de Tukey e Two-way ANOVA (análise de variância de duas vias) seguida do pós-teste de Bonferroni. A sobrevida dos animais foi expressa como porcentagem de animais vivos. Taxa de sobrevida foi realizada através do método de Kaplan-Meier.

RESULTADOS

8. Resultados

8.1 Avaliação da taxa de sobrevida durante os sete primeiros dias após a cirurgia de CLP/Sham.

A partir da figura 5 podemos observar que os animais pertencentes ao grupo CLP H₂, tratados durante 10 dias consecutivos com inalação de H₂ a 2%, em um fluxo de 4l/min, durante um período de 1h, apresentaram uma taxa de sobrevida de 65% durante os sete primeiros dias após a cirurgia. Já os animais sépticos, apresentaram uma taxa de sobrevida menor (48%). Esse resultado sugere que a estratégia terapêutica é capaz de conferir ação protetora aos animais durante a sepse. Todos os animais Sham sobreviveram independente do tratamento. Taxa de sobrevida foi realizada através do método de Kaplan-Meier.

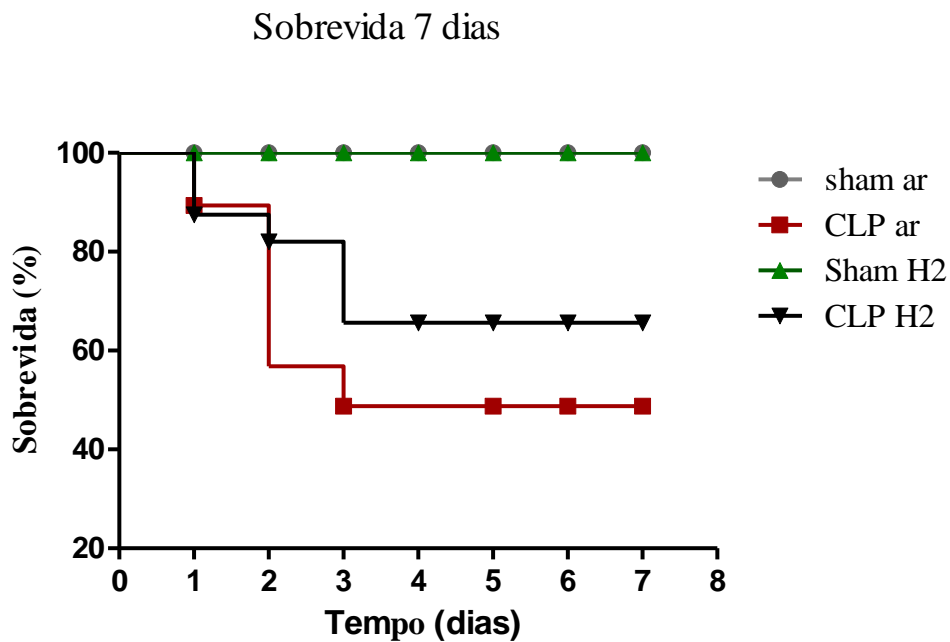


Figura 5. Taxa de sobrevida dos animais durante os sete primeiros dias após a cirurgia de CLP/Sham. O tratamento com H₂ a 2% foi capaz de aumentar a taxa de sobrevida dos animais sépticos.

8.2 Avaliação da memória e cognição por meio de testes comportamentais

8.2.1 Avaliação da memória de habituação por meio do teste campo aberto (*Open Field*).

Conforme observamos na figura 6, todos os quatro grupos experimentais apresentaram uma mesma distância percorrida e número de levantamento na sessão treino, indicando que os animais pertencentes ao grupo CLP e CLP H₂, que foram submetidos a uma resposta inflamatória exacerbada, não apresentaram comprometimento motor para a realização do teste comportamental. Quando analisamos o comportamento dos animais entre as sessões treino e teste, observamos que os animais CLP ar não apresentaram diferença em relação à distância percorrida e número de levantamentos entre as duas sessões, indicando um comprometimento da memória de habituação. Ao observarmos os animais tratados com H₂ nota-se que os mesmos apresentaram diferença entre as duas sessões obtendo uma menor distância percorrida ($P < 0,01$) e menor número de levantamentos ($P < 0,01$) semelhante aos animais pertencentes aos grupos controle Sham H₂ e Sham ar, demonstrando que a estratégia terapêutica pode prevenir a perda de memória a curto prazo.

a)

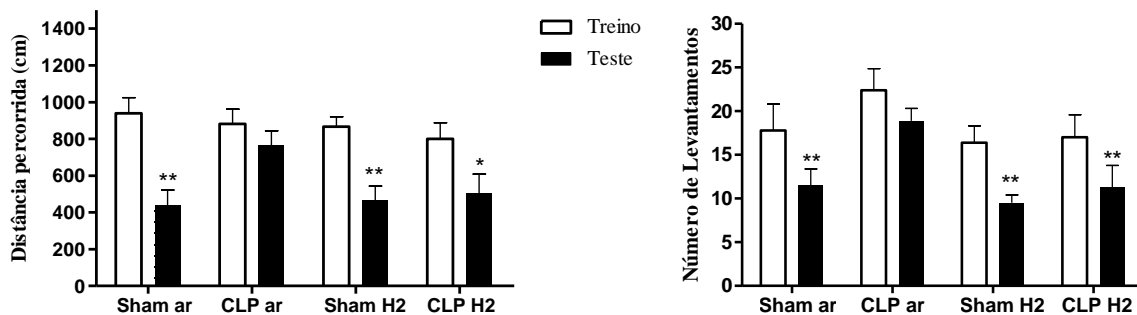
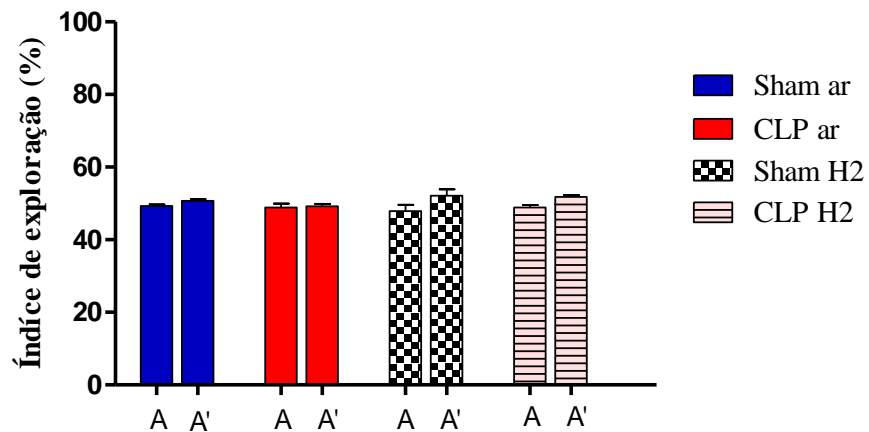


Figura 6. Avaliação do tratamento com H₂ a 2% na memória de habituação em ratos submetidos ao choque séptico. Os ratos sépticos tiveram um comprometimento na memória de habituação, não apresentando diferença na distância percorrida (a) e número de levantamento (b) entre as sessões treino e teste. Os animais tratados não apresentaram prejuízo na memória de habituação. Valores expressos como média \pm EPM. Análise estatística por Teste t-pareado e Mann Whitney. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ comparadas à sessão treino.

8.2.2 Avaliação da memória a curto e em longo prazo através do teste de reconhecimento de objetos.

Na figura 6.1, podemos observar que na sessão treino (a) todos os animais apresentaram o mesmo índice de exploração. Esse dado indica que todos os grupos tiveram o mesmo tempo de exploração quando dois objetos iguais são apresentados aos animais pela primeira vez. O que sugere não haver comprometimento na retenção da informação ou empenho motor. Ao analisarmos o segundo gráfico, observamos que não houve diferença no índice de exploração entre o objeto velho (A') e o objeto novo (B), pelos animais pertencentes ao grupo CLP ar, na avaliação da memória em curto prazo. O que difere do grupo CLP H₂ (P<0,001) e os grupos controle Sham ar e Sham H₂ (p< 0,001), que demonstraram uma maior preferência em explorar o objeto novo. Esse mesmo resultado foi observado na avaliação da memória discriminativa em longo prazo quando o objeto B foi trocado por outro objeto (C). Os animais sépticos não demonstraram diferença significativa no índice de exploração indicando ter ocorrido um comprometimento da memória em longo prazo. Em contra partida, os animais tratados também apresentaram um maior índice de exploração do objeto novo (p<0,001). Os dois últimos gráficos representam o tempo total de exploração dos animais na avaliação da memória em curto e em longo prazo. É possível observar que não houve diferença estatística em nenhuma das sessões demonstrando não ter ocorrido comprometimento motor.

b)



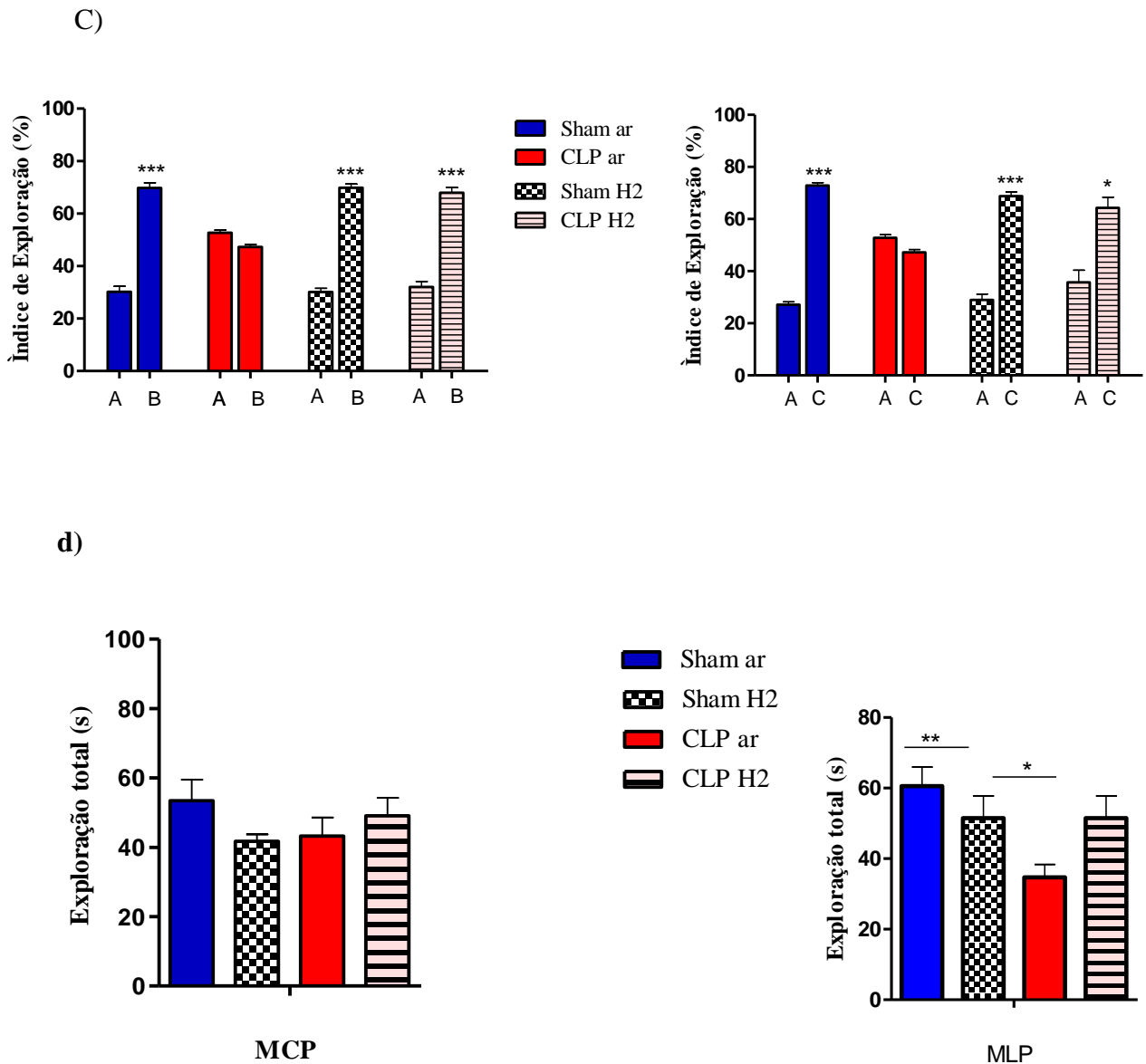


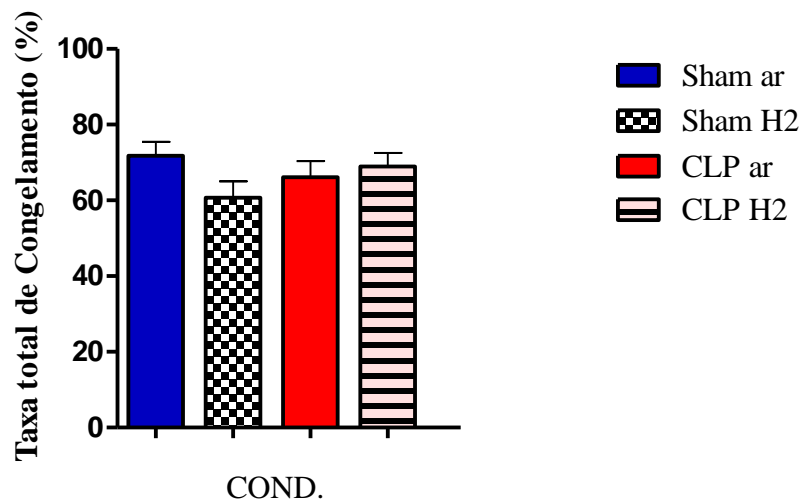
Figura 6.1 – Avaliação do tratamento com H2 a 2% em ratos submetidos ao choque séptico sobre a memória discriminativa. O índice representado em porcentagem indica a exploração de cada objeto durante as três seções. **(a)** Na sessão treino não foi observado diferença estatística na exploração dos objetos A e A' entre os grupos. **(b)** Não houve diferença no índice de exploração do objeto novo (B) em relação ao objeto familiar (A) pelos animais sépticos, na sessão teste, quando avaliado memória em curto prazo (MCP). Também não encontramos diferença no índice de exploração entre o objeto familiar (A) e o objeto novo (C), na avaliação da memória em longo prazo (MLP) nos animais pertencentes ao grupo CLP ar. A análise estatística foi realizada por meio de Teste t-pareado e Mann Whitney. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ comparados ao objeto familiar (A). **(c)** Taxa de exploração total dos objetos. Durante a fase de teste, o tempo total de exploração dos objetos (familiar + novo) não diferiu significativamente entre os tratamentos na avaliação da memória em curto prazo. Entretanto, os animais pertencentes ao grupo CLP ar tiveram um índice de exploração total menor na avaliação da memória

em longo prazo, quando comparado aos demais grupos ($p < 0.05$). Análise estatística por One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Todas as barras representam a média \pm EPM ($n = 10$ animais por grupo).

8.2.3 Avaliação da memória aversiva através do teste do medo condicionado ao contexto

Ao observarmos a figura 6.2, podemos observar que durante a sessão de condicionamento não houve diferença estatística na taxa de congelamento entre os grupos experimentais. Esse resultado indica que os animais não tiveram comprometimento na retenção do contexto aversivo pelo qual foram submetidos. No entanto, os animais sépticos apresentaram diminuição significativa da taxa de congelamento 24 h ($P > 0,01$) e 5 dias ($P > 0,001$) após o condicionamento indicando enfraquecimento na evocação da memória aversiva.

e)



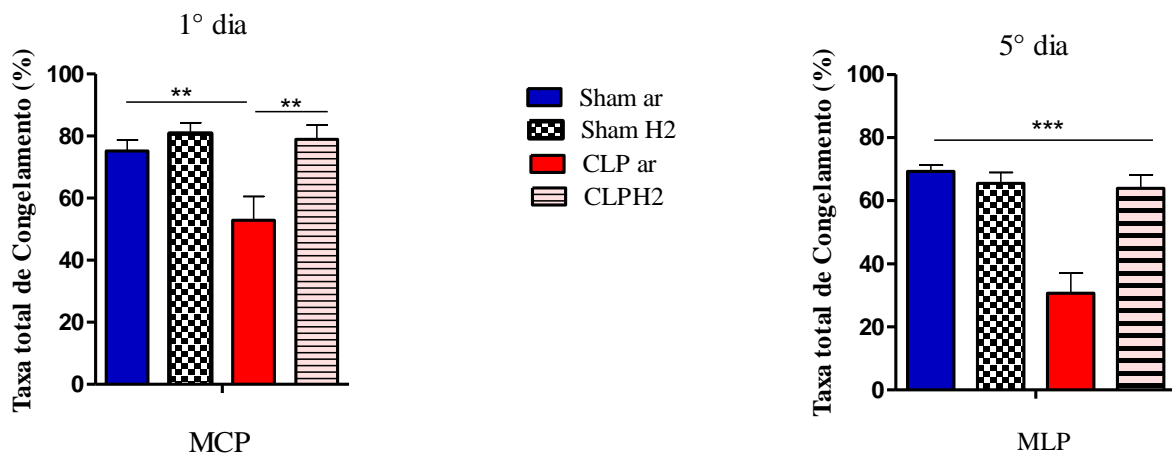


Figura 6.2. Avaliação do tratamento com H₂ a 2%, em ratos submetidos ao choque sobre a memória aversiva. Ao observarmos a figura 6.2, podemos observar que na sessão de condicionamento aversivo (COND.) todos os grupos não apresentaram diferença estatística significativa na taxa de congelamento (a); (b) Os animais pertencentes ao grupo CLP ar apresentaram menor taxa de congelamento 24h após terem passado pela sessão de condicionamento, sugerindo déficit na evocação da memória aversiva em curto prazo (MCP). Na avaliação da memória em longo prazo (MLP), observou-se que os animais sépticos também apresentaram uma taxa de congelamento menor e que o tratamento com H₂, permitiu aos animais sépticos apresentarem uma taxa de congelamento semelhante ao grupo normal. Para análise estatística deste teste comportamental foi utilizado o Teste t-pareado e Mann Whitney. P * < 0,05 na MCP e P*** < 0,001 na MLP.

9.0 Determinação do efeito do H₂ a 2% sobre a concentração plasmática de citocinas inflamatórias.

Por meio da análise da figura 7.0 A, podemos observar que o modelo CLP foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos da citocina IL-6 no soro dos animais sépticos, quando comparado aos animais controle (P<0,05) que praticamente não apresentaram níveis aumentados. De maneira similar ocorreu com os níveis plasmáticos de IL-β quando comparado o grupo CLP ao grupo Sham controle (P<0,05). Por meio da análise dos dois primeiros gráficos também pode-se observar que não houve diferença estatística entre o grupo CLP ar e CLP H₂. Ao analisarmos os níveis plasmáticos da citocina anti-inflamatória IL-10 é possível notar que em período de 24h após a cirurgia de CLP/Sham, houve um aumento na concentração plasmática de IL-10 nos animais sépticos (P<0,05), quando comparado ao grupo controle e que não houve diferença estatística entre o grupo CLP ar e CLP H₂.

a)

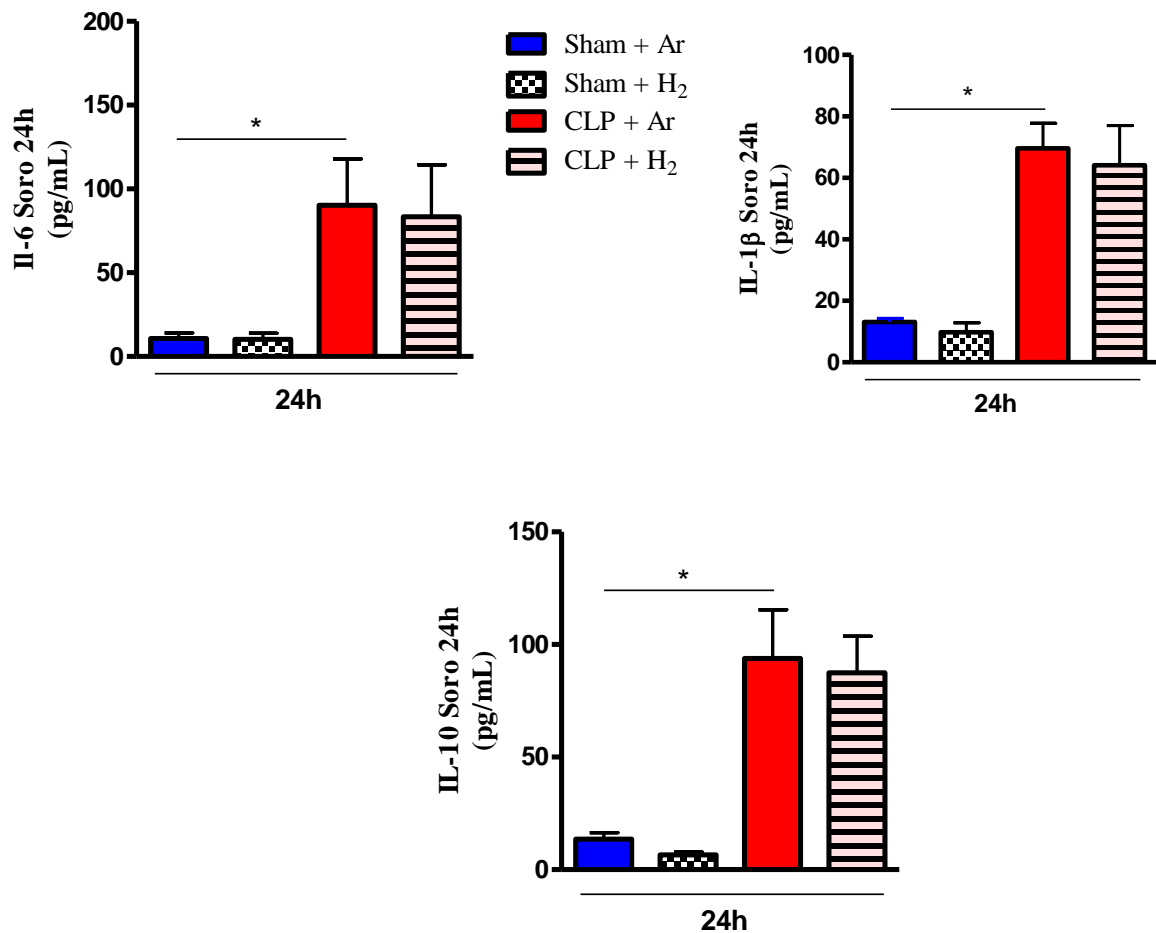


Figura 7.0. Determinação dos níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias de fase aguda em animais sépticos. Por meio da análise da figura 7.0, pode-se observar que os animais sépticos apresentaram aumento nos níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias IL 1 β e IL-6, 24 h após a cirurgia de CLP. Também é possível notar que não houve diferença estatística entre o grupo de animais sépticos tratados e não tratados com H₂. De maneira similar o CLP promoveu aumento dos níveis plasmático da citocina anti-inflamatória IL-10 não apresentando diferença em relação ao grupo CLP H₂.

9.1. Determinação do efeito do H₂ a 2% sobre a concentração plasmática de TBARS.

Ao analisarmos a figura 7.1 pode-se notar que a sepse induziu um aumento nos níveis de TBARS ($P < 0,05$) no plasma dos animais em 24h. E que o tratamento com inalação do H₂

a 2% levou a uma diminuição dos níveis no plasma dos animais CLP tratado com a inalação de H₂ (P > 0,01).

b)

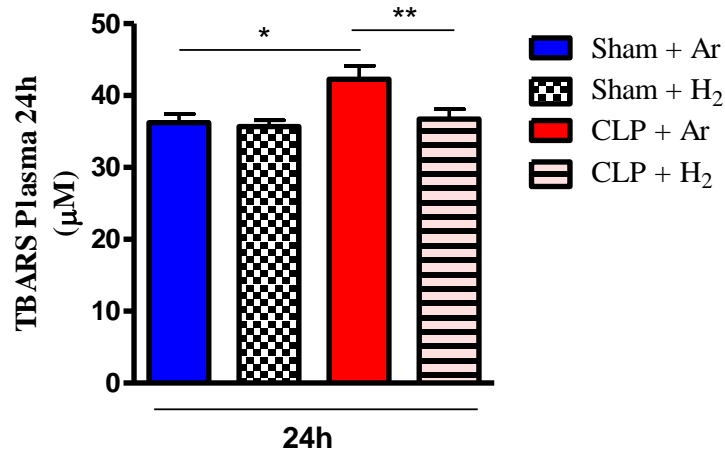


Figura 7.1. Determinação dos níveis plasmáticos das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em 24h após a indução da resposta inflamatória. A partir do gráfico pode-se observar que houve um maior aumento de TBARS no plasma dos animais pertencentes ao grupo CLP ar quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). E que o tratamento com inalação do H₂ a 2% por um período de 3h diminuiu a concentração de TBARS ($p < 0,01$).

9.2 Determinação do efeito do H₂ a 2% sobre a concentração plasmática de enzimas antioxidantes.

Por meio da figura 7.2 podemos observar que não houve diferença estatística entre os grupos na concentração no soro da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em 24h. Em relação à concentração dos níveis da enzima catalase observa-se que os animais tratados com a inalação do H₂ apresentaram um aumento significativo nos níveis de catalase quando comparado aos grupos controle. Também é possível notar que os animais CLP ar tiveram um maior aumento na concentração da enzima ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo CLP tratado com H₂ e aos respectivos grupos controle, Sham ar e Sham H₂ ($p < 0,01$). Ao observar a capacidade antioxidante no soro dos animais em 24 h, identificou-se que não houve diferença estatística entre os grupos quando comparado aos respectivos grupos controle ($p < 0,05$) Sham

ar e Sham H₂. Já quando comparado ao grupo CLP ar nota-se que os animais sépticos não tratados com o gás apresentam níveis maiores da enzima catalase em 24 h ($p < 0,05$). E ao observarmos a capacidade antioxidante não houve diferença estatística entre os grupos.

c)

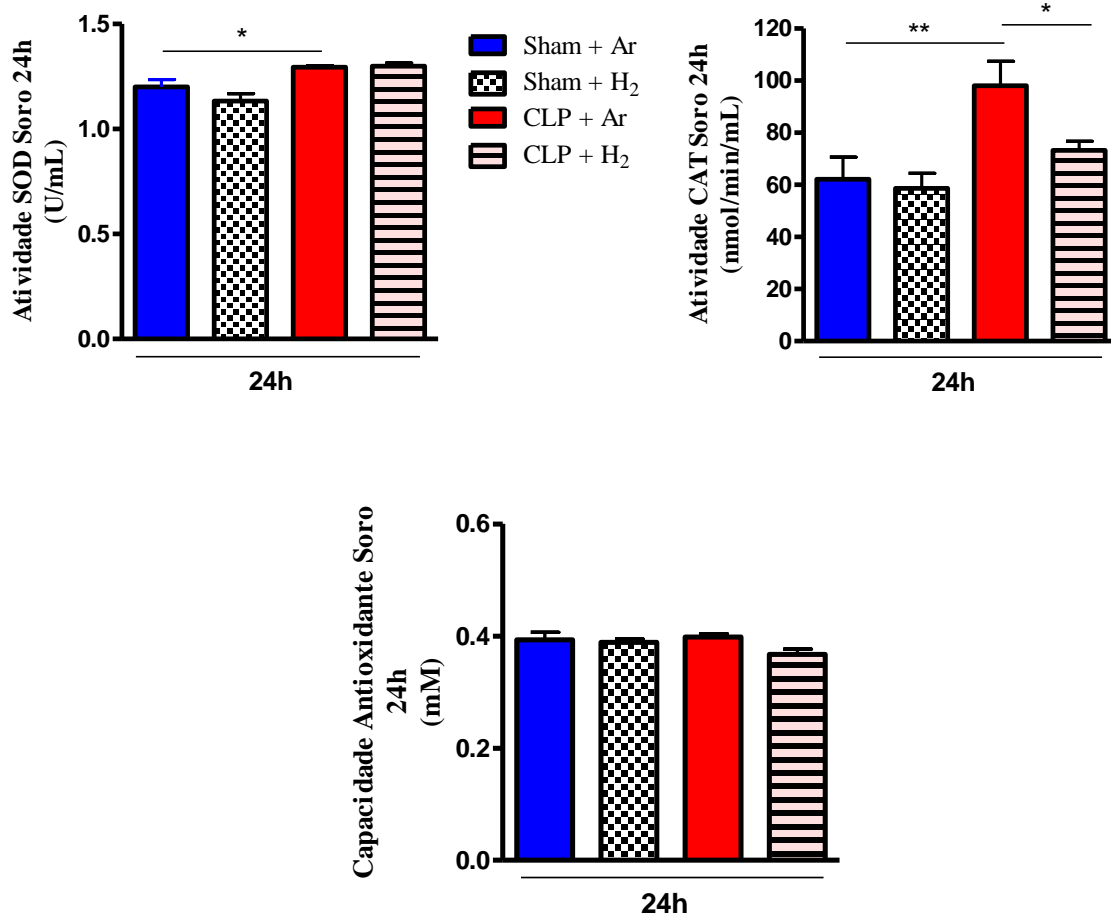


Figura 7.2. Determinação dos níveis plasmáticos das enzimas antioxidantes SOD, catalase e da capacidade antioxidante. A partir da figura 7.2 foi observado que não houve diferença estatística entre os grupos na concentração da enzima SOD em 24h após a cirurgia. Houve um aumento significativo na concentração da enzima catalase nos animais tratados com H₂.

9.3. Determinação do efeito do H₂ a 2% sobre a concentração plasmática de nitrato.

Como podemos observar na figura 7.3, o modelo experimental CLP, para indução da resposta inflamatória sistêmica, aumentou os níveis de nitrato em um período de 24h. Observa-se aumento nas concentrações plasmáticas de nitrato nos animais pertencentes ao grupo CLP ar e CLP H₂ apresentando diferença estatística significativa ($p > 0,001$) em relação aos grupos controle Sham ar e Sham H₂, porém, sem apresentar diferenças significativas entre si.

Também não foram observadas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de nitrato entre o Sham ar e Sham H₂ em nenhum intervalo de tempo analisado.

a)

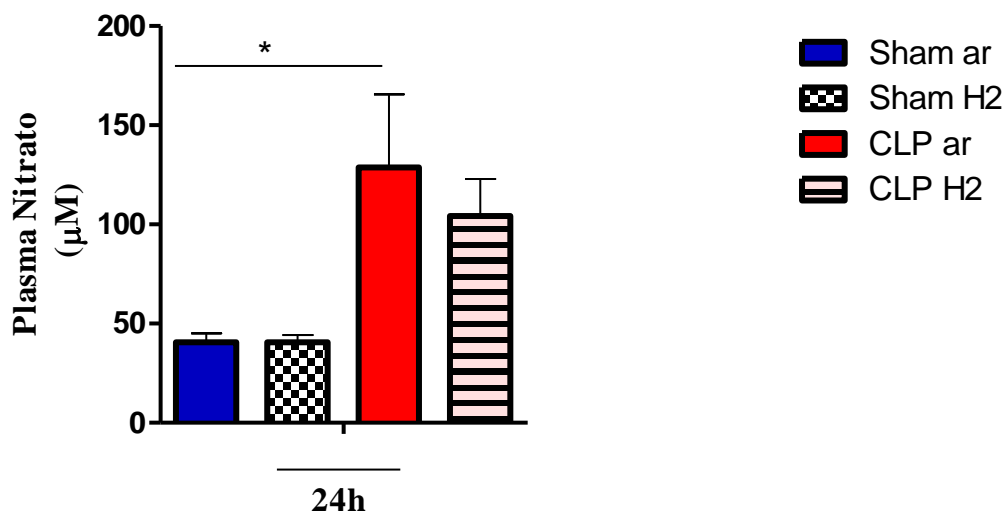


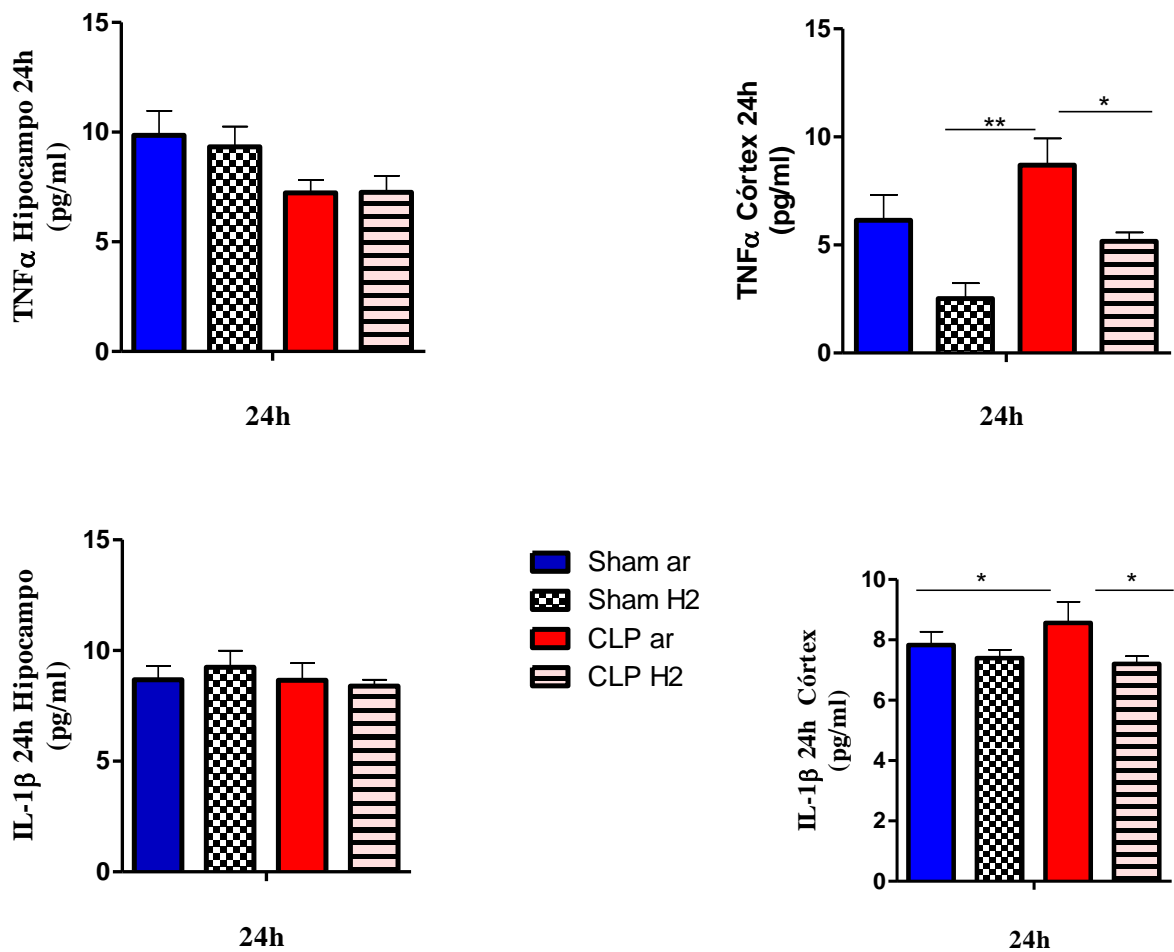
Figura 7.3. Efeito do H₂ a 2% nas concentrações plasmáticas de nitrato de ratos em choque sépticos. Valores expressos como média \pm EPM. Diferença de * $p < 0,05$ quando comparados os grupos CPL ar e Sham ar os grupos Sham H₂ e CLP ar.

9.4. Determinação do efeito do H₂ a 2% sobre a concentração de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória no Hipocampo e córtex pré-frontal.

O choque séptico induzido pelo modelo CLP promoveu o aumento na concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF α no córtex pré-frontal ($p < 0,05$) em 24h.

Também é possível notar que o tratamento com a inalação do H₂ diminuiu consideravelmente os níveis das citocinas, no córtex pré-frontal ($p < 0,05$). Já ao observar as concentrações das citocinas no hipocampo, nota-se que não houve diferença estatística significativa nos níveis de IL-1 β e TNF α entre os grupos experimentais. Por outro lado, é possível observar que a sepse promoveu um aumento significativo nas concentrações da citocina de fase aguda IL-6 no hipocampo ($p > 0,01$) e que a inalação do H₂ foi capaz de diminuir de maneira significativa os níveis IL-6 ($p > 0,01$). Além disso pode-se analisar que animais pertencentes ao grupo CLP ar não apresentaram diferença estatística em relação aos níveis de IL-10 no hipocampo, quando comparado aos animais tratados com H₂. Por outro lado, houve um maior aumento de IL-10 no córtex pré-frontal em animais tratados.

a)



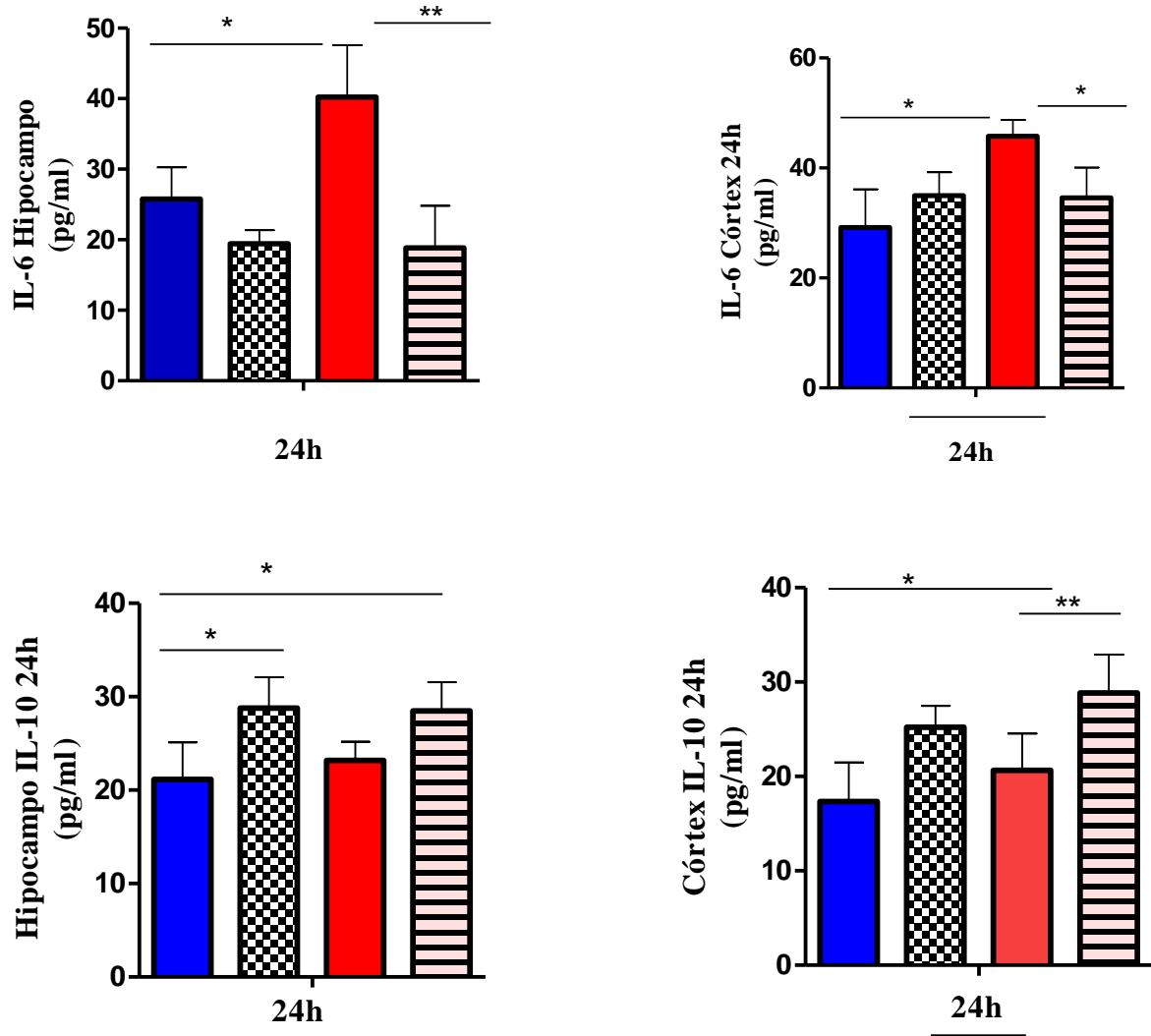


Figura 7.4. Determinação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias de fase aguda em animais sépticos. Por meio da análise da figura 7.4, pode-se observar que os animais sépticos apresentaram aumento nos níveis das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α no córtex pré-frontal, 24 h após a cirurgia de CLP. Também foi possível notar que não houve diferença estatística entre o grupo de animais sépticos tratados e não tratados com H2 nas concentrações de IL 1 β e TNF α no hipocampo entre os quatro grupos experimentais. Por outro lado houve um aumento nas concentrações de IL-6, 24h após a cirurgia no hipocampo. De maneira similar foi possível notar que o H2 diminuiu consideravelmente os níveis de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α córtex pré-frontal e de IL-6 no hipocampo.

9.3. Determinação do efeito do H2 a 2% sobre a concentração de nitrato no córtex e Hipocampo.

Por meio da análise da figura 7.5 é possível observar que não houve aumento da concentração de nitrato em um período de 24h após a realização da perfuração cecal, no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais pertencentes ao grupo CLP.

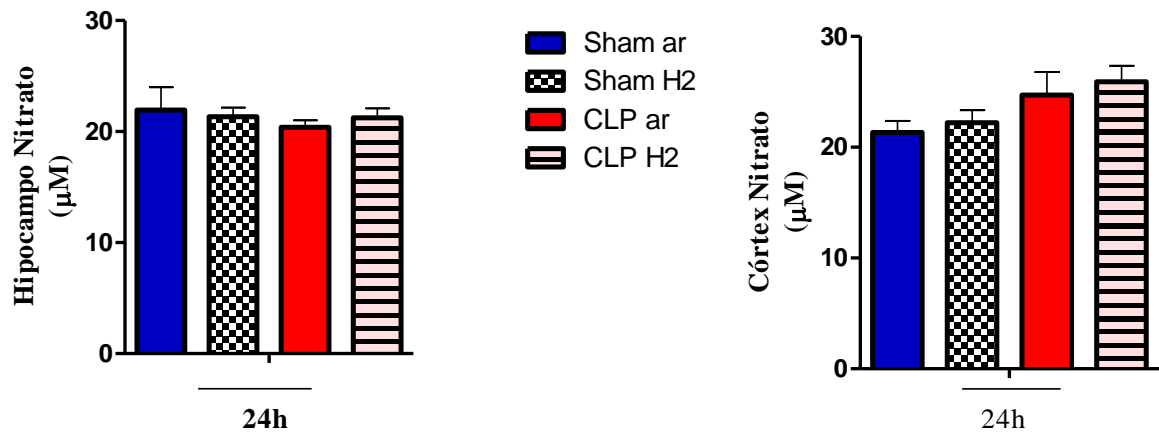


Figura 7.5 Determinação da concentração de nitrato no hipocampo e córtex pré-frontal em animais sépticos. Não foi observado diferença estatística na concentração de nitrato no hipocampo e córtex pré-frontal.

DISCUSSÃO

10. Discussão

Este estudo teve como objetivo avaliar se a administração do Hidrogênio molecular (H_2) é capaz atenuar o dano cognitivo e a perda de memória, ocasionados pela resposta inflamatória sistêmica exacerbada. Em conjunto nossos resultados demonstram que a administração do H_2 por via inalatória foi capaz de conferir ação protetora sobre o SNC durante o choque séptico induzido pelo modelo de CLP.

Durante muito tempo o H_2 foi considerado um gás inerte onde não era conhecido os seus efeitos fisiológicos, que foram relatados na literatura pela primeira vez em 1975. Os pesquisadores Dole *et al*, foram pioneiros em descrever na literatura que o H_2 poderia exercer ações antioxidantes a partir da reação exotérmica, combinando-se com o radical hidroxil, resultando na formação de água (DOLE *et al*, 1975). Entretanto, somente em 2007, que foi publicado o primeiro trabalho científico demonstrando que este gás atua como um potente agente antioxidante (OHSAWA *et al*, 2007). Subsequentemente, novos trabalhos começaram a ser publicados, demonstrando que o H_2 também possui ações anti-inflamatórias e anti-apoptóticas (ISHIBASHI, 2013), bem como tem a capacidade de regular vias de sinalização intracelular e agir em processos de transcrição de genes (HANOOKA *et al*. 2011, OHTA2011).

Para induzir uma resposta inflamatória exacerbada utilizamos o modelo de CLP, em que foi realizado uma oclusão a nível do ceco perfurado uma única vez para extravasamento de conteúdo cecal. Este método é classificado como sepse letal e apresenta uma taxa de mortalidade em torno de 90% (Andrades et al, 2005). Neste trabalho, o mesmo modelo utilizado resultou em 65% da mortalidade dos animais pertencentes ao grupo CLP ar, em um período de sete dias de avaliação. Por outro lado, os animais que receberam um tratamento prolongado com H_2 apresentaram uma redução de 20% na taxa de mortalidade. Este resultado se assemelha a dois trabalhos realizados por Xie et al, em que o tratamento a partir da primeira e sexta hora com inalação do H_2 a 2%, aumentou consideravelmente a sobrevivência após os animais serem expostos a uma resposta inflamatória exacerbada (Xie et al 2010). De tal maneira, acreditamos que essa melhora na sobrevivência, seja consequente da interferência do H_2 no sistema redox.

Durante o choque séptico ocorre uma grande produção de mediadores inflamatórios que provoca importantes alterações fisiológicas tais como anormalidades circulatórias, metabólicas e celulares, ocasionando o comprometimento de distintos sistemas (Parillo, 1993, NAPOLITANO 2018). A disfunção do SNC devido a uma inflamação sistêmica exacerbada, por

exemplo, pode ocorrer em uma frequência de 8 a 70 % em pacientes com sepse (Sprung et al, 1990). Já está bem descrito na literatura que os sobreviventes, apresentam em longo prazo dano cognitivo, incluindo alteração de atenção e concentração, pensamentos desordenados, e perda de memória (Gordon et al, 2004). Assim, realizamos testes comportamentais para avaliar o efeito do tratamento prolongado com H₂ sobre o dano cognitivo e perda de memória, ocasionados pela encefalopatia séptica. Em conjunto nossos resultados demonstram que os ratos sobreviventes à sepse apresentaram déficit na aprendizagem e memória, ao realizarem os testes de habituação ao campo aberto, reconhecimento de objetos e contexto aversivo. Ressaltamos que os animais pertencentes ao grupo CLP ar, não apresentaram comprometimento motor para a realização dos testes comportamentais, como demonstra os resultados da sessão treino do campo aberto, em que não houve diferença na distância percorrida e número de levantamentos na arena, entre os grupos experimentais. Estes resultados são importantes visto que, em modelos animais com indução da inflamação sistêmica a partir da injeção do LPS em altas doses, ocorre redução da atividade locomotora que poderia dificultar a deambulação dos animais tornando-se um fator limitante para a realização dos testes comportamentais (Kozak et al, 1994).

No teste de habituação ao campo aberto avaliamos a memória de trabalho ou também denominada em curto prazo. Encontramos que os animais sépticos não apresentaram diferença entre a sessão treino, em que foi avaliado a distância percorrida e número de levantamentos, e a sessão teste onde os mesmos foram novamente recolocados no mesmo local 24 h após a primeira sessão. Por outro lado, observamos que os animais tratados com o H₂ exibiram uma menor diferença na exploração entre as duas seções, sugerindo que estes animais tiveram um reconhecimento do ambiente anteriormente explorado, indicando menor comprometimento da aprendizagem e memória em curto prazo. Em relação a tarefa de reconhecimento de objeto avaliamos a memória em curto e em longo prazo e identificamos que o choque séptico comprometeu os dois tipos de memória. Ennaceur e Delacour, descreveram a tarefa de reconhecimento de objetos para ratos, como um comportamento espontâneo do animal que, independe de aprendizagem ou esforço para que seja executada, não ocorrendo recompensa ou aversividade (Ennaceur e Delacour, 1988). Por meio dos nossos resultados foi possível notar que quando dois objetos iguais foram apresentados aos animais dos quatro grupos experimentais, os mesmos obtiveram um índice de exploração semelhante. Entretanto, 20 min após a primeira exposição foi realizado a troca de um dos objetos, e identificamos que os animais pertencentes ao grupo CLP ar não tiveram uma discriminação entre os dois objetos,

apresentando um mesmo índice de exploração. A memória de reconhecimento ou discriminativa, apresenta-se preservada se o animal gastar um maior tempo explorando o novo objeto em relação ao familiar (Ennaceur e Delacour, 1988). Além disso, observamos que os ratos tratados durante 10 dias com H₂, notavelmente tiveram uma maior discriminação entre os elementos, explorando mais o objeto novo, sugerindo que a estratégia terapêutica foi capaz de prevenir ou atenuar a perda da memória em curto prazo. Quando avaliamos a memória em longo prazo, que foi realizada 24h após o primeiro teste, um novo objeto foi reapresentado aos animais, e notamos resposta semelhante. Nessa situação, animais sépticos tratados com H₂, demonstraram o estado de memória em longo prazo preservada, o que nos sugere que o H₂ possui ação neuroprotetora capaz de atenuar e prevenir o dano cognitivo decorrente do choque séptico.

Um dos meios para se estudar a memória aversiva é o teste do medo associado ao contexto (Fanselow, 1980; Fendt e Fanselow, 1999; Maren e Quirk, 2004). Para avaliar este tipo de memória, no presente trabalho, os animais foram introduzidos em uma caixa e receberam o estímulo aversivo. O medo condicionado ao qual os animais foram submetidos é caracterizado por uma aquisição rápida do aprendizado por associação simples (Fanselow w.; Lester, 1988). Ao apresentar uma resposta emocional condicionada (REC) espera-se que os animais apresentem um comportamento típico de medo que caracteriza-se principalmente por congelamento (freezing) e manifestações sintomáticas neurovegetativas como, vocalizações ultrassônicas, analgesia, defecação e aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (Antoniadis e McDonald, 1999; Carrive, 2000). Ao analisarmos os resultados encontramos uma elevada taxa de congelamento na sessão de condicionamento, não apresentando diferença estatística entre os grupos experimentais. Esses dados nos sugerem que todos os animais que foram submetidos a um estímulo aversivo de grande intensidade foram capazes de adquirir e consolidar a informação, que posteriormente seria armazenada. Por outro lado, na sessão de teste em que os animais foram reintroduzidos ao mesmo contexto da primeira sessão, sem o estímulo aversivo, encontramos que somente os animais sépticos não tratados com a inalação do H₂ demonstraram uma menor taxa de congelamento 24h e 5d após o condicionamento.

Estruturas cerebrais como o córtex pré-frontal possui um importante papel para a formação da memória em curto prazo, que caracteriza-se pelo armazenamento temporário das informações que podem durar segundos ou minutos; bem como há uma interassociação entre os dados adquiridos e armazenados (Funahashi, 1993.; Postle et al, 2006). O hipocampo também é outra região de extrema importância para a consolidação da memória e organização

das respostas motoras e vegetativas envolvidas no teste de condicionamento aversivo, tais como a vocalização ultrassônica e o congelamento (Chaudhury et al 2002). Além do hipocampo, a amígdala central regula a expressão do medo diante de estímulos ambientais atuando como um botão de disparo da emoção (Ledoux et al, 1984). Entretanto, suas ações são diretamente dependes de interconexões com o hipocampo, responsável por enviar informações relacionadas ao contexto para os núcleos lateral e basolateral da amígdala onde ocorre o armazenamento (Fendt e Fanselow, 1999). A integridade do hipocampo humano é considerado de extrema importância para a formação da memória episódica, capacidade de recordar experiências pessoais e consolidar o conhecimento (Burgess et al 2002.; Eichenhaum, 2004). Assim o dano neuronal de estruturas cerebrais como o córtex pré-frontal e o hipocampo durante a encefalopatia séptica estão diretamente relacionado a alterações cognitivas e de memória.

Neste contexto estudos tem demonstrado o envolvimento do estresse oxidativo no declínio cognitivo durante a inflamação sistêmica exacerbada (Barichello et al, 2006; Hernanes et al, 2014). As ERO e as ERN, produzidas em grande quantidade durante este processo, são consideradas importantes mediadoras do dano cerebral. O cérebro possui maior vulnerabilidade a lesões oxidativas devido a fatores fisiológicos, anatômicos e funcionais; visto que possui apenas 2% do peso corporal em humanos, e um consumo em condições normais de 20% do oxigênio (O₂) consumido, em consequência a sua alta taxa metabólica, que apresenta-se elevada em situações de neuroinflamação (Patel, M, 2016). O maior consumo do O₂ cerebral em grande parte ocorre para fornecer um eficiente aceitador de elétrons para a geração de adenosina trifosfato (ATP) pela cadeia mitocondrial. O ATP é extremamente importante para os processos cerebrais que consomem energia tais como, potenciais de ação, exocitose de neurotransmissores, maquinaria sináptica, neurotransmissão e reações enzimáticas (Salim, 2017.; Frank et al, 2006.; Jucait et al 2015). Além disso, fatores endógenos tornam o SNC extremamente vulnerável ao estresse oxidativo, uma vez que o cérebro possui uma modesta maquinaria antioxidante quando comparado a outros sistemas, dependência de neurotransmissores excitotóxicos e auto-oxidáveis, grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados que são propensos a peroxidação lipídica e uma carga de cálcio elevada (Hulbert et al., 2007). Quando ocorre uma excessiva produção de espécies reativas (ERs), as mesmas promovem extensa oxidação de proteínas, DNA e lipídeos, induzindo a disfunção das organelas dos neurônios, disfunção da BHE e assim resultam em morte neuronal.

Como um exemplo de desordens neuronais promovidas pelas ERs encontra-se o comprometimento do potencial de longa duração (LTP), um tipo de plasticidade neuronal que

permite a formação da memória (O'Dell et al, 1991; Stevens, Wang, 1993; Verma et al, 1993; Zhuo et al, 1993; Knapp, Klann, 2002). Deste modo, acreditamos que a perda de memória evidente e demonstrada por meio dos testes comportamentais em animais sépticos não tratados, tenha como uma das principais causas o estresse oxidativo a nível periférico e central. Ressaltamos que a melhora ou prevenção do comprometimento cognitivo observado nos animais tratados com H₂ pode ser consequente das propriedades antioxidantes deste gás demonstradas em diversos trabalhos (Ohta, 2014.; Ishibashi et al, 2014.; Chen et al, 2013.; Fukuda et al, 2007.; Hayashi et al, 2011.; Hayashida et al, 2008).

Através dos resultados preliminares dos testes comportamentais, que indicaram ter ocorrido perda da memória e comprometimento cognitivo, avaliamos o efeito agudo do tratamento com H₂, sobre as concentrações de mediadores inflamatórios e estresse oxidativo, que quando não atenuados em fases iniciais e produzidos de maneira excessiva durante a inflamação sistêmica podem conduzir ao comprometimento de estruturas cerebrais. Encontramos que a realização da ligação e perfuração do ceco, provocou aumento das citocinas pró-inflamatórias de fase aguda IL-1 β e IL-6 no soro dos animais, 24h após a cirurgia, bem como aumentou a concentração da citocina anti-inflamatória IL-10. Catalão e colaboradores de maneira similar, demonstraram que em um período de 48 h após realização do CLP, ocorre um aumento na concentração plasmática dessas citocinas em animais sépticos. Além disso, Wei et al, evidenciaram que em 24 h após o CLP, sucede um aumento de citocinas de fase aguda tais como TNF α e IL-6 em estruturas do SNC como o hipocampo (Wie et al, 2012). Também foi possível observar um aumento plasmático de indicadores do estresse oxidativo como o NO e TBARS no plasma dos animais. Neste trabalho, observamos que o grupo experimental tratado com H₂, não tiveram diminuição dos níveis de IL-1 β e IL-6 no soro em um período de 24h após a cirurgia. Acreditamos que a ação anti-inflamatória do H₂ demonstrada em outros trabalhos (Mao et al. 2009.; Huang et al. 2011), não tenha sido observado, por talvez sua ação ter ocorrido antes das 24h, visto que por ser uma pequena molécula se difunde rapidamente.

Observamos que à administração do gás de maneira aguda, foi capaz de diminuir o estresse oxidativo, observado por meio da redução da concentração das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), formados em situações de peroxidação lipídica. Bem como que sua ação também promoveu aumento da atividade da enzima antioxidante catalase, sugerindo ser um potente agente antioxidativo. Entretanto, não encontramos diferença nos níveis plasmáticos de superóxido dismutase (SOD) que manteve-se praticamente igual em todos os grupos experimentais, o que nos sugere que a diminuição das concentrações de TBARS tenha

ocorrido principalmente pela ação da enzima catalase que promove a degradação do H₂O₂ em água (Halliwell e Gutteridge 1992). Osawa e colaboradores demonstraram pela primeira vez, por meio da realização de cultura de células PC12, que o H₂ possui uma importante ação antioxidante. Neste trabalho, o cultivo de células foi incubado com antimicina, para induzir a formação de ERs tais como H₂O₂, OH⁻, O₂⁻, ONOO⁻ e NO e expostas ao gás H₂ que foi capaz de atenuar potentes espécies reativas como OH⁻ e ONOO⁻, e não modificou os níveis de outras ERs que desempenham importantes ações em diferentes processos fisiológicos como o NO, que também não teve seus níveis diminuídos no plasma dos animais em um período de 24h neste trabalho. Além disso, Kawamura et al, sugeriram que o efeito antioxidante do H₂ ocorre devido ao aumento da atividade e expressão do fator de transcrição nuclear Nrf2, que promove a transcrição de inúmeros genes de enzimas antioxidantes de fase secundária. Animais nocautes para Nrf2 expostos a uma situação de hiperoxia, que resulta na formação de uma grande quantidade de ERO, não apresentaram aumento da expressão da enzima de fase II heme oxigenase (HO-1), que em condições de estresse oxidativo são altamente induzidas desempenhando papel crucial em proteger o organismo contra o dano tecidual promovido por inflamação e oxidação (Fredenburgh, et al 2007.; Morse et al, 2009.; Kawamura, et al 2013).

Na literatura científica está bem demonstrado a interação entre o sistema periférico e o SNC durante a inflamação sistêmica exacerbada, sendo conhecido que mediadores inflamatórios produzidos a nível periférico podem desempenhar ações em estruturas centrais (Dal-Pizzol et al., 2013; Towner et al., 2013; Sankowski et al., 2015). Uma das principais vias que promove esta sinalização, ocorre por meio dos CVOs, que são estruturas altamente vascularizadas e que não possuem BHE (Miselis et al, 19779; Camacho e Philips, 1981.; Blatteis et al, 1987.; Stitt, 1990). Os CVOs estão localizados próximos a áreas do cérebro que são conhecidas em responder a alterações imune periférica; como exemplo temos o órgão vasculoso da lamina terminal (OVLT), situado próximo a área pré-óptica do hipotálamo, que controla a resposta febril. Outro núcleo pertencente ao grupo dos CVOs é área postrema (AP), que está situada acima do núcleo do trato solitário (NTS), considerado o maior transmissor de aferências viscerais (Quan, 2014). Além disso, sabe-se que os CVOs expressam componentes do sistema imune inato e adaptativo, tais como receptores toll-like, CD14, receptores de citocinas pró-inflamatórias, e possuem neurônios cuja terminações se projetam para o NTS e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), conhecidos como alvos da ativação neuroimune (Kawano e Masuko, 2010; Akrou, 2009). Mediadores inflamatórios como as citocinas produzidas na fase aguda da inflamação também podem alcançar níveis centrais atravessando a BHE por meio da ativação de seus receptores, que quando ativados promovem a endocitose

de citocinas. Este mecanismo de transporte é altamente controlado por fatores tissulares e solúveis bem como, encontra-se regulado durante a inflamação sistêmica (Akrouf et al, 2009). De maneira interessante um trabalho realizado por Pan e Kastin, demonstram que o transporte de TNF α via BHE é quase totalmente dependente da ativação específica de seus receptores presentes nesta estrutura. Neste estudo animais nocautes para TNFR1 e TNFR2 tiveram o transporte de TNF α pela BHE abolida (Pan e Kastin, 2002). Também há uma terceira via de comunicação do sistema imune periférico e o SNC durante a resposta imune, que ocorre via nervo vago, considerado como um sensor visceral da inflamação. Fibras vagais não mielinizadas com terminações livres, possuem receptores para citocinas em seus terminais axonais e são sensíveis a alterações químicas e mecânicas que ocorrem em vísceras. Em presença de tais alterações suas terminações enviam impulsos nervosos aferentes que chegam ao NTS e a partir deste núcleo há projeções a outras estruturas autonômicas. Quando no interior do cérebro, os mediadores inflamatórios são capazes de interagir e ativar diferentes células cerebrais, ocasionando por exemplo, a ativação das células gliais como astrócitos e micróglia, que conduzem a uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias, NO e ERs (Stellwagen e Malenka, 2006; Handa *et al.*, 2008; Semmler *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2009; Sonnevile *et al.*, 2013). Dessa forma, observamos que a inflamação sistêmica induzida pelo CLP aumentou os níveis das citocinas pró-inflamatórias não somente a nível periférico, mas também a nível central. Foi possível notar que ocorreu um aumento dos níveis de TNF α , IL-1 β e IL-6 no córtex pré-frontal dos animais sépticos e que o tratamento com o H₂ reduziu os níveis destes mediadores inflamatórios. Por outro lado, não identificamos diferença nos níveis de TNF α e IL-1 β no hipocampo entre os grupos experimentais. Entretanto, foi possível observar que animais sépticos tiveram os níveis de IL-6 aumentado nesta estrutura, bem como que o H₂ diminuiu consideravelmente os seus níveis. Encontramos também, que não houve diferença estatística significativa entre os grupos quando avaliado a concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 no hipocampo, que por sua vez apresentou-se aumentada somente no córtex pré-frontal dos animais tratados.

Devido ao fato dos neurônios e suas sinapses estarem localizados depois da BHE durante muito tempo não acreditava-se que o sistema imune poderia influenciar no processo de comunicação neural. Entretanto, importantes pesquisas demonstraram que o SNC é intensamente influenciado pela inflamação periférica e central, sendo capaz de modular a eficácia da plasticidade sináptica (Di Filippo et al, 2008). Componentes imunes solúveis tais como citocinas pró-inflamatórias que tiveram seus níveis aumentados a nível periférico e central no presente projeto, são capazes de interferir em processos de transmissão sináptica em condições fisiológicas e patológicas, pelos quais podem ocasionar desmielinização da bainha

de mielina e assim ocasionar comprometimento estrutural e funcional dos neurônios. Além disso, a neuroinflamação prove um aumento da liberação anormal de tais mediadores em sítios sinápticos que compromete a homeostase sináptica (Mancini et al, 2017). Tais modificações ocasionadas resultam na ativação da apoptose neuronal considerado um processo depende de ATP e que ocorre por meio de diferentes mecanismos, que são dependentes de fatores como o equilíbrio de proteínas pró-apoptóticas, variedade de estímulos e do início do ciclo celular (Hotchikiss et a, 2001.; Bantel.; Schulze-Osthoff, 2009.; Memos et al, 2009).

Em situações de estresse oxidativo a nível central, ocorre ativação da via apoptótica intrínseca, mediada pela caspase-9, que se inicia por meio da mitocôndria. Após ocorrer o estresse celular mediado pelas ERO, as proteínas pró-apoptóticas (BAX, BAK, BID e BAD) deslocam-se para a superfície da mitocôndria onde as proteínas pró-apoptóticas (BCL-2 e a Bcl-XL) estão localizadas (Hengartner, 2000). Com o desbalanço entre proteínas pró e anti-apoptótica, ocorre alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial com subsequente liberação de proteínas para o citosol, tais como o citocromo c que interage com a protease Apaf-1 e pró-caspase-9, formando o aptosomo, o qual intermedia a clivagem da caspase-3 e consequente morte celular (Mignotte.; Vayssiere, 1998; Gupta, 2003).

A citocina pró inflamatória TNF α também é capaz de induzir a morte celular por meio da ativação da via extrínseca de apoptose, acionada através da ativação do receptor de necrose tumoral 1 (TNFR1) (Lavrik, 2014). Quando ativado ocorre diversos processos que culminam na formação do *death-inducing signaling complex* (DISC), um agregado de moléculas que ocasiona a clivagem de proteases para uma forma ativa, acionando a caspase-3 e subsequente morte celular (MC Guire et al, 2011).

Os mecanismos moleculares pelos quais o gás H₂ que foi considerado durante muito tempo como biologicamente inerte possui ações anti-inflamatória são pouco conhecidos, quando comparado ao que se sabe sobre suas propriedades antioxidante. Alguns trabalhos recentes como o realizado por Wang et al, demonstram que esse gás assim como NO é capaz de agir em vias de sinalização intracelular. Neste estudo em que foi utilizado o modelo experimental da doença Alzheimer por meio da injeção ventricular de A β amiloide, observou-se que os animais tratados com injeção intraperitoneal de salina rica em H₂, apresentaram diminuição da expressão de uma das MAP kinases implicada na morte celular induzida por estresse oxidativo. Demonstrou-se que o H₂ foi capaz de diminuir a expressão da Kinase JNK, que prove o acionamento da proteína ativadora AP-1, responsável em induzir a expressão gênica de citocinas pró-inflamatória. Além disso, também houve diminuição da expressão do

fator transcricional NfκB implicado na via clássica da inflamação (Wang et al, 2011). De maneira similar Itoh et al, corroboraram com tais evidências, mostrando que cultura de macrófagos estimulada com LPS e exposta ao H₂, exibiram diminuição na expressão das quinases P38 e JNK bem como do fator transcricional Nf-κB (Itoh et al 2011).

Outro mecanismo molecular atualmente proposto seria que o H₂ ao interagir e modificar quimicamente mediadores lipídicos secundários, formados através da oxidação de fosfolípidos diminua os níveis de citocinas pró-inflamatórias (Iuchi et al, 2016). Sabe-se que os fosfolípidos desempenham funções importantes em diferentes processos biológicos tais como estruturação da membrana celular que proporciona sua impermeabilidade a componentes hidrossolúveis, bem como são conhecidos como uma importante fonte de energia para o organismo. Além disso, componentes lipídicos podem atuar como mediadores de sinalização intracelular em situações fisiológicas e patológicas. Pré-dispostos a sofrerem oxidação química por ação das ERO e ERN em situações normais e de estresse oxidativo, os fosfolípidos produzem mediadores secundários que quando possuem características estruturais consideradas normais podem atuar em receptores de membrana tais como os GPCRs (Bochkov et al, 2016.; Nilsson et al, 2006.; Reis et al., 2012; Fruhwirth et al, 2007.; Ashraf et al, 2009). Fosfolípidos oxidados como o 1-palmitoil-2(5-oxovaleroil)-sn-glicerol-3-fosforicolina (POVPC) e o 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicerol-3-fosforicolina (PGPC) derivados da 1-palmitoil-2-araquidonil-sn-glicerol-3-fosforicolina (PAPC), presente em lipoproteínas plasmáticas como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) tem sido considerado como indutores da expressão de citocinas inflamatórias (Bockov et al, 2010). Um trabalho pioneiro realizado por Bockov et al, demonstrou que o PAPC oxidado promove um aumento do influxo de Ca²⁺ que procedeu a translocação do fator de transcrição de células T (NFAT) do citosol para o núcleo, o que poderia resultar no aumento da transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Os pesquisadores também observaram que houve um aumento da expressão da quinase regulada por sinal extra celular (ERK) (Bockov et al, 2002). Neste contexto, Iuchi et al demonstraram que cultivo de células THP-1 que apresentaram formação de mediadores lipídicos secundários, quando foram expostas a uma concentração 1,3% do H₂, tiveram esses mediadores quimicamente modificados, passando a não serem mais reconhecido por receptores GPCRs e assim conduziu a uma inativação do fator transcricional NFAT, em consequência da diminuição da sinalização mediada por Ca²⁺ que ao combinar-se com a proteína cálcio calmodulina, conduzem a desfosforilação da enzima calcineurina, que por sua vez quando em sua forma ativa aciona NFAT (Iuchi et al, 2016).

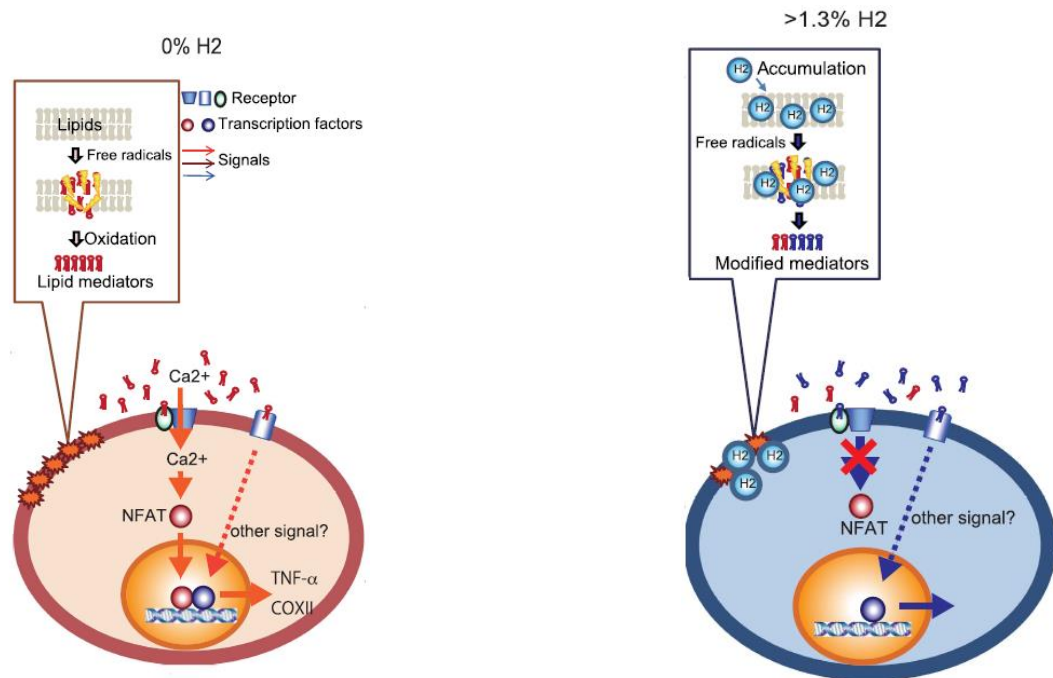


Figura 8.0. Representação do mecanismo molecular do H₂. Imagem Extraída de Iuchi et al, 2016 **Scientific Reports** v.6, p. 18971, 2016.

Além desses dois mecanismos recentemente propostos, acreditamos e propomos que o H₂ possa diminuir as citocinas pró-inflamatórias por meio de uma terceira via de sinalização intracelular, que consiste na diminuição da atividade do Nf-kB mediada por Nrf2. Como demonstrado em estudos realizados por XIE; Shih e Kawamura, este gás é capaz de aumentar a expressão e atividade do fator transcricional Nrf2, que promove a expressão gênica de enzimas antioxidantes, sendo considerado um dos principais elementos da maquinaria antioxidante em diferentes sistemas (XIE et al 2014.; Shih et al 2003 e Kawamura, et al 2013). A primeira evidencia científica que demonstrou a interconexão entre esses dois fatores de transcrição foi um trabalho realizado por Pan e colaboradores. Os pesquisadores evidenciaram que cultura de astrócitos provinda de camundongos nocaute para Nrf2, apresentaram uma intensificada produção de citocinas pró-inflamatória dependente da via clássica Nf-kB, em resposta ao dano cerebral (Pan et al. 2012). Outros estudos como o realizado por Timmulappa et al, comprovaram que ratos deficientes em Nrf2 apresentam um aumento da atividade da subunidade IKKβ responsável em ocasionar a fosforilação de IKKα e sua subsequente degradação pela proteína β-TrCP-Skp1-Cullin 1, por meio do processo ubiquitina-proteossoma. Assim, as subunidades P65 e P50 se tornam livres para se translocar até o núcleo onde medeiam a transcrição gênica (Timmulappa et al, 2006). Nrf2 e Nf-kB tem suas atividades diretamente regulada por fatores redox e a diminuição da atividade de Nrf2 está associado com o aumento

do estresse oxidativo e nitrosativo, amplificando a produção de mediadores inflamatórios uma vez que, Nf-kB apresentasse mais ativo em condições de estresse oxidativo (Ganesh et al, 2013). O mecanismo esclarecido sobre os possíveis efeitos inibitórios de Nf-kB sobre Nrf2 é a competição dessas duas proteínas pelo fator transcricional co-ativador CBP (proteína ligada a CREB), que tem uma atividade intrínseca de histona acetil transferase que ocasiona o afrouxamento da cromatina expondo o DNA para a maquinaria de transcrição (Sun et al, 2009.; Liu et al, 2008). Dessa forma, em situações em que ocorre uma superexpressão e ativação da subunidade P65 do Nf-kB como a que ocorre na sepse há uma diminuição da disponibilidade do CBP para o complexo Nrf2-Are se ligar ao núcleo, favorecendo a transcrição de genes mediado por KB (Liu et al, 2008). Neste contexto acreditamos que a nova estratégia terapêutica baseada na inalação do H₂ que proporciona o aumento da concentração e atividade do fator transcricional Nrf2 seja benéfica em processos neurodegenerativo mediado por inflamação e estresse oxidativo.

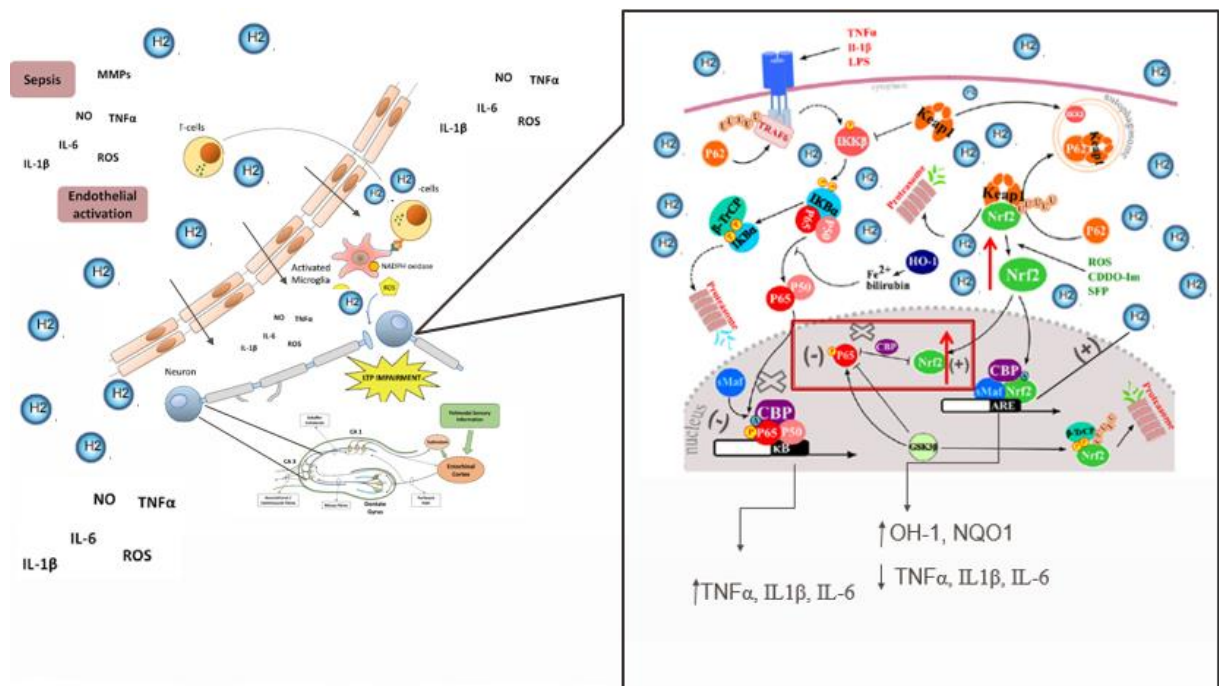


Figura 8.1. Representação de um possível mecanismo de ação do H₂ que confere ação anti-inflamatória. 1. Durante a inflamação sistêmica exacerbada mediadores inflamatórios produzidos a nível periférico chegam ao SNC por diferentes vias, conduzindo a ativação de células glia como a micróglia que passa a sintetizar maiores quantidades de citocinas, NO e ERO_s a nível central. 2. Estruturas relacionadas com a formação e consolidação da memória, tais como o hipocampo e o córtex pré-frontal são vulneráveis ao estresse oxidativo que compromete a homeostase da transmissão sináptica. 4. O gás H₂ possui a capacidade de atravessar a BHE exercendo suas ações anti-inflamatória e antioxidante a nível central. 5. Em situações em que há produção de mediadores inflamatórios por meio da ativação do fator de transcrição NF-κB, há também uma diminuição na atuação do fator de transcrição Nrf2, que promove a formação de enzimas antioxidantes. Esses dois fatores de transcrição competem pelo mesmo

sítio de ligação na proteína CBP, que permite a ambos acessos aos elementos transcrpcionais KB e ARE. Em situações de inflamação sistêmica exacerbada como na sepse há uma maior ativação de Nf-kb por indução de citocinas inflamatórias, padrões moleculares como o LPS e ERO. Assim, há uma maior atuação de Nf-kb que diminui o desempenho de Nrf2. Estudos recentes propõe que o H₂ aumenta a atividade transcricional de NRF2, bem como de sua disponibilidade. Assim, este gás além de conferir uma importante ação antioxidante ao aumentar a quantidade de enzimas antioxidante, também possivelmente exerce ação anti-inflamatória de forma indireta ao potencializar a ação de NRF2. Imagens extraídas e modificadas de: Timmulappa et al, 2006. *The Journal of Clinical Investigation.*; Mancini et al, 2017. *Multiple Sclerosis and Demyelinating Disorders.*

CONCLUSÃO

O conjunto de dados nos permite concluir que:

O modelo CLP para indução da sepse experimental pode auxiliar na investigação dos mecanismos biológicos envolvidos no dano cognitivo associado a neuroinflamação.

O tratamento prolongado com a inalação do H₂ é capaz de aumentar consideravelmente a sobrevivência dos animais sépticos em decorrência da sua ação no sistema redox.

Há uma diminuição da perda da memória e comprometimento cognitivo nos animais tratados com H₂ em período prolongado.

O modelo experimental CLP induziu um aumento nos níveis das citocinas pró e anti-inflamatória TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, bem como aumentou os níveis de NO nos animais sépticos a nível periférico e central.

O tratamento agudo com a inalação do H₂, 24h após a indução do choque séptico, aparentemente não reduz os níveis de citocinas pró-inflamatória e do NO produzidos periféricamente. Entretanto, é capaz de reduzir os níveis de mediadores inflamatórios centralmente em estruturas diretamente relacionadas com a memória.

REFERÊNCIAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANDRADES, M. et al. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. **J Surg Res**, v. 125, n. 1, p. 68-72, May 2005.
- AKROUT, N.; SHARSSHAR, T.; ANNANE, D. Mechanisms of Brain Signaling During Sepsis. **Current Neuropharmacology**, v , 7, p. 296-301, 2009.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual review of plant biology**, v. 55, p. 373-99, 2004.
- ANTONIADIS, E. A.; MCDONALD, R. J. Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. **Behav Brain Res**, v. 101, p. 1-13, 1999.
- ASHRAF, M.Z.; KAR, N.S.; PODREZ, E.A. Oxidized Phospholipids: Biomarker for Cardiovascular Diseases. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, p. 1241–1244, 2009.
- BANKS, W.A. The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation. **Brain Behav Immun**, v. 44, n. 6, p. 1-8, 2015.
- BANTEL, H.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Cell death in sepsis: A matter of how, when, and whwre. **Critic Care**, v.13, p.173-177, 2009.
- BARICHELLO, T. et al. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. **Crit Care Med**, v. 34, n. 3, p. 886-9, 2006.
- BAYIR, H; KAGAN, V.E. Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis there is nothing as practical as a good theory. **Crit Care**, v. 12(1): P.206, 2008.
- BEAL, M.F. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. **Neurobiology**, v. 6, p. 661-666, 1996.
- BLATTEIS, C.M.; HALES, J.R.; MCKINLEY.; M.J., FAWCETT, A.A. Role of the anteroventral third ventricle region in fever in sheep. **Can. J. Physiol. Pharmacol**, v. 65, p. 1255–1260, 1987.
- BOCHKOV, V.N.; MECHTCHERIAKOVA, D.; LUCEMA, M.; HUBER, J.; MALLI, R.; GRAIER, W.F.; HOFER, E.; BINDER, B.R.; LEITINGER, N. Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 an Ca⁺⁺/NFAT. **Blood Journal**, v.99, p.199-206, 2002.
- BOCHKOV, V. N. *et al.* Generation and biological activities of oxidized phospholipids. **Antioxid. Redox Signal**, v. 12, p. 1009–1059, 2010.
- BOCHKOV, V.N.; GESSLBAER. B.; MAUERHOFER, C.; PHILIPPOVA, M.; ERNE, P.; OSKOLKOVA, O. Pleiotropic effects of oxidized phospholipids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, p.6-24, 2016.
- BRANDON, J.D.; JIPING,T.; JOHN, H.Z. The evolution of molecular hydrogen: a noteworthy potential therapy with clinical significance. **Medical gas research**, v. 3, p. 2-12, 2013.
- BROOKS, H. F.; OSABUTEY, C. K.; MOSS, R. F.; ANDREWS, P. L.; DAVIES, D. C. Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. **Metab Brain Dis**, v. 22, n.3, p.353-73, 2007.

- BURGESS, N.; MAGUIRE, E.A.; O KEEFE, J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. **Neuron**, v. 35, p.625–641, 2002.
- CAI J, KANG Z.; LIU WW.; LUO X.; QIANG S, et al. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. **Neurosci Lett**, vol.441, p. 167–172, 2008.
- CALABRESI, P.; CASTRIOTO, A.; DI FILIPP, M.; PICCONI, B. New experimental and clinical links between the hippocampus and the dopaminergic system in Parkinson's disease. **Lancet Neurol**. v.12, p.811–821, 2013.
- CAMACHO, A.; PHILLIPS. M.I. Horseradish peroxidase study in rat of the neural connections of the organum vasculosum of lamina terminalis. **Neurosci, Lett**, v.25, p.201-204, 1981.
- CARRIVE, P. Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. **Brain Res**, v. 858, p. 440-5, 2000.
- CATALÃO, C.H.; SANTOS-JUNIOR, N.N.; COSTA, L.H.A.; SOUZA, A.O.; ALBERICI, L.C.; ROCHA, M.J.A. Brain Oxidative Stress During Experimental Sepsis is Attenuated by Simvastatin Administration. **Mol Neurobiol**.v.54, n.9, p.7008-7018, 2017.
- CHAUDHURY, D.; COLWELL, C. S. Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. **Behav Brain Res**, v. 133, n. 1, p. 95-108, 2002.
- CHEN Y, JIANG J, MIAO H, CHEN X, SUN X, LI Y: Hydrogen-rich saline attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia by inhibiting reactive oxygen species production and inactivating the Ras-ERK1/2-MEK1/2 and Akt pathways. **Int J Mol Med**, v.31, p.597-606, 2013.
- DI FILIPPO, M.; SAARCHIELLI, P.; CALABRASI,P. Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel, immune-centred, therapeutic approach to neurological disorders. **Trends Pharmacol Sci**, v.29, p.402–12, 2008.
- DAL-PIZZOL, F.; RITTER C.; CASSOL-JR.; O.J, REZIN, G.T.; PETRONILHO, F.; ZUGNO, A.I.; QUEVEDO, J.; STRECK, E.L. Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis. **Neurochem**. v. 35, p.1–12, 2010.
- DAL-PIZZOL, F. et al. Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis. **Mol Neurobiol**, v. 48, n. 1, p. 62-70, 2013.
- DEVLIN, T.; Manual de bioquímica.7º Ed. **Blucher**. P. 601-605, 2011.
- DOLE, M .; WILSON, F.R. Fife WP: Hyperbaric hydrogen therapy: a possible treatment for cancer. **Science**, v.190, p.152–154, 1975.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988.
- EICHENBAUM, H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. **Neuron**, v.44, p. 109–120, 2004.
- FANSELOW, M. S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. **Pavlov J Biol Sci**, v. 15, n. 4, p. 177-82, 1980.

- FANSELOW, M.; LESTER, L.S. A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: Predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behavior. **Evolution and Learning** ,p.185-212, 1988
- FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 5, p. 743-60, 1999.
- FUNAHASHI, S.; BRUCE, C. J.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Dorsolateral prefrontal lesions and oculomotor delayed-response performance: evidence for mnemonic "scotomas". **J Neurosci**, v. 13, n. 4, p. 1479-97, 1993.
- FUKUDA K, ASOH, S.; ISHIKAWA, M.; YAMAMOTO, Y.; OHSAWA, I.; OHTA, S: Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. **Biochem Biophys Res Commun**, v.361, p. 670-674, 2007.
- FRUWIRTH, G.O.; LOIDL, A.; HERMETTER, A. Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 718–736, 2007.
- FLIERL, M. A; RITTIRSCH, D; HUBER-LANG, M. S; STAHEL, P. F. Pathophysiology of septicencephalopathy an unsolved puzzle. **Crit. Care**, v.14, 2010.
- FREDENBURGH, L.E.; PERELLA, M.A.; MITSIALIS, S.A. The role of heme oxygenase-1 in pulmonary diseases. **Am. J. Respir Cell Mol Biol**, v.36, p.158-165, 2007.
- FRANK, M.G. The mystery of sleep function: current per-spectives and future directions. **Rev. Neurosci**, v.17,p.375–392, 2006.
- GANESH, Y.; NEGI, G.; SHARMA, S.S.; KUMAR,A. Potential therapeutic effects of simultaneous targeting of the Nrf2 an NF- Kappa B pathways in diabetic neuropath. **Redox Bio**, v.01, p.394-397, 2013.
- GHAFOURIFAR, P; CADENAS E. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Trends Pharmacol Science** , v.26, p. 190-1995, 2005.
- GORDON, S.M.; JACKSON, J.C.; ELY, E:W.; BURGER, C.; HOPKINS, R.O. Clinical identification of cognitive impairment in ICU survivors: Insights for intensivists. **Intensive Care Med**, v.30, p. 1997-2008, 2004.
- GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Int J Oncol**, v.22, p.15-20, 2003.
- HALLMAN, M.; RAMET, M.; EZEKOWITZ, R. A. Toll-like receptors as sensors of pathogens. **Pediatr Res**. n. 50, v. 1, p. 325-21, 2001.
- HANAOKA T, KAMIMURA N, YOKOTA T, TAKAI S, OHTA S: Molecular hydrogen protects chondrocytes from oxidative stress and indirectly alters gene expressions through reducing peroxynitrite derived from nitric oxide. **Med Gas Res**, v.1 p. 18, 2011.
- HANDA, O.; STEPHEN, J.; CEPINSKAS, G. Role of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in activation and dysfunction of cerebrovascular endothelial cells during early onsets of sepsis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, n. 4, p. H1712-9, 2008.
- HAYASHI, T.; YOSHIOKA T.; HASEGAWA. K.; MIYAMURA, M.; MORI. T, UKIMURA, A.; MATSUMURA, Y.; ISHIZAKA, N: Inhalation of hydrogen gas attenuates left ventricular

remodeling induced by intermittent hypoxia in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** , v.301.p.1062-1069, 2011.

HAYASHIDA. K.; SANO, M.; OHSAWA. I.; SHINMURA. K.; TAMAKI. K.;KIMURA, K.; ENDO. J.; KATAYAMA, T.; KAWAMURA, A.; KOHSAKA. S.; MAKINO, S.; OHTA, S.; OGAWA, S.; FUKUDA, K: Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia reperfusion injury. **Biochem Biophys Res Commun**, v.373, p.30-35, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M: Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. **Anupdate. FEBS Lett**,v. **307**, p. 108-112, 1992.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.404, p.770-776, 2000.

HENRY, C. J. et al. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 3, p. 309-17, 2009.

HERNANDES, M. S. et al. The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. **J Neuroinflammation**, v. 11, p. 36, 2014.

HULBERT, A.J.; BUFFENSTEIN, R.; BUTTEMER, W.A. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Re*, v.87, p.1175–1213, 2007.

HUANG Y, XIE K, LI J, XU N, GONG G, WANG G, YU Y, DONG H, XIONG L: Beneficial effects of hydrogen gas against spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. **Brain Res**, v. 1378, p. 125-136, 2011.

HOTCHIKISS, R.S. et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis. A critical role of the lymphocyte. **Nat. Immunol**, v.1, p.496-501, 2000.

ILKER, M.K.; MURAT, U.; SINAN, B.; AYBERK, B. Sepsis induces apoptotic cell death in different regions of the brain in a rat model of sepsis. **Acta Neurobiol Exp**, v.70, p.246-260, 2010.

IUCHI K, IMOTO A, KAMIMURA N, NISHIMAKI K, ICHIMIYA H, YOKOTA T, OHTA S: Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators. **Sci Rep** v.6: p.18971, 2016.

ISHIBASHI, T: Molecular hydrogen: new antioxidant and anti-inflammatory therapy for rheumatoid arthritis and related diseases. **Curr Pharm**, v.19, p. 6375-6381, 2013.

ISHIBASHI, T.; SATO, B.; SHIBATA, S.; SAKAI, T.; HARA, Y.; NARITOMI, Y.; KOYANAGI, S.; HARA, H.; NAGAO, T:Therapeutic efficacy of infused molecular hydrogen in saline on rheumatoid arthritis: a randomized, doubleblind, placebo-controlled pilot study. **Int Immunopharmacol**, v.21, p. 468-473, 2014.

ITOH, T.; HAMADA, N.; TERAZAWA, N.; ITO, M.; OHNO,K.; INCHIHARA, M.; NOZAWA, Y.; ITO, M. Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon c-induced

nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, p. 143–149, 2011.

JUCAIT, A. et al. Effect of the myeloperoxidase inhibitor AZD3241 on microglia: a PET study in Parkinson's disease. **Brain**, v. 138, p.2687–2700, 2015.

LAVRIK, I.N. Systems biology of death receptor networks: Live and let die. **Cell Death Dis**, v.5, p.1259, 2014.

LEDOUX, J. E.; SAKAGUCHI, A.; REIS, D. J. Subcortical efferent projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. **J Neurosci**, v. 4, n. 3, p. 683-98, 1984.

LIU, G.; G, H.; QU, J.; SHEN, X. NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. **Biochimica et biophysica acta**, V. 1783, p.713-727, 2008.

LIU, W.; TANG, Y.; FENG, J. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. **Life Sci**, v.89, n.5-6, p. 141-6, 2011.

LONGONO, G.; ROCCA, MA.; PAGANI, E.; RICCITELLI, GC.; COLOMBO, B.; RODEGHER, M.; FALINI, A.; COMI, G.; FILIPPI, M. Deficits in memory and visuospatial learning correlate with regional hippocampal atrophy in MS. **Brain Struct Funct**, V.220, P. 435–44, 20015.

LUHESHI, G. N. Cytokines and Fever: Mechanisms and Sites of Action. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 29, p. 856-83-9, 1998.

MAREN, S.; QUIRK, G. J. Neuronal signaling of fear memory. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 11, p. 844-52, 2004.

MAO YF, ZHENG XF, CAI JM, YOU XM, DENG XM, ZHANG JH, JIANG L, SUN XJ: Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. **Biochem Biophys Res Commun** v.381, p.602-605, 2009.

MANCINI, A.; GAETANI, L.; GREGORIO DI, M.; TOZZI, A.; GHIGLIERI, V.; CALABRESI, P.; FILIPPO, M. Hippocampal neuroplasticity and inflammation: relevance for multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis and Demyelinating Disorders**, v. 2, p.2-12, 2017.

MC GUIRE, C.; BEYAERT, R.; VAN LOO, G. Death receptor signaling in central nervous system inflammation and demyelination. **Trends Neurosci**, v.34, p.619-628, 2011.

MEMOS, N. et al. Administration of Human Protein-C concentrate prevents apoptotic brain cell death experimental sepsis. **Brain Res**, v.1264, p.119-126, 2009.

MISELIS, R.R.; SHAPIRO, R.E.; RAND, P.J. Subfornical organ efferents to neural systems for control of body water. **Scienc**, v.205, p.1022-1025, 1979.

MIGNOTTE, B.; VAYSSIERE, J.L. Mitochondria and apoptosis. **Eur. J.Biochem**, v.252, p.1-15, 1998.

MORSE, D.; LIN, L.; CHOI, A:M.; RYTER, S.W. Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. **Free Radic Bio Med**, v.47,p.1-12, 2009.

- NAPOLITANO, L.M. Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. **Surgical Infections**, n.2 v. 19, p. 108-117, 2018.
- NIEDERMAN, M. S.; FEIN, A.M. Sepsis syndrome, the adult respiratory distress syndrome, and nosocomial pneumonia. A common clinical sequence. **Clin. Chest. Med.**, v.11, p 633-656, 1990.
- NISSON, J.; FREDRIKSON, G.N.; CHYU, K.Y.; SHAH, P.; BJORKBACKA, H. Oxidized lipoprotein autoimmunity: an emerging drug target in cardiovascular disease. **Future Lipidol**, v.1, p.321–330, 2006
- O'DELL, T.J.; HAWKINS, R.D, KADEL, E.R.; ARANCIO, O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. **Proc Natl Acad**, v. 88, p.11285–11289, 1991.
- OHNO, K.; MIKAKO, ITO.; ICHIHARA, M.; ITO, M. Molecular hydrogen as an emerging therapeutic medical gas for neurodegenerative and other diseases, **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2012, p. 1- 11, 2012.
- OHTA S: Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. **Pharmacol Ther**, v.144,p.1-11, 2014.
- OHSAWA, I.; ISHIKAWA, M.; TAKAHASHI et al. Hydrogen acts as a therapeutic Antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. **Nat Med**, v. 13, p. 688-694, 2007.
- OPAL, S. M. The host response to endotoxin, antilipoplysaccharide strategies and the management of severe sepsis. **Int. J. Med. Microbiol**, v.297, p. 365-77, 2007.
- PAN, W.; KASTIN, A.J. TNF α transport across the Blood–Brain Barrier Is Abolished in Receptor Knockout Mice. **Experimental Neurology**, v. 174, p.193–200, 2002.
- PAN, H.; WANG. H.; ZHU, L.; MAO, L. The absence of Nrf2 enhances NF-kB-Dependent inflammation following scratch injury in mouse primary cultured astrocytes. **Mediators Inflamm**, v.2012, p-1-9. 2012.
- PATEL, M. Targeting oxidative stress in central nervous system disorders. **Cell Press**, v. 37, p.768-778, 2016.
- PARRILLO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N Engl J Med**, v. 328, n. 20, p. 1471-7,1993. **American Physiol**, v.266, p.125-135, 1994.
- POSTLE, B. R. Working memory as an emergent property of the mind and brain. **Neuroscience**, v. 139, n. 1, p. 23-38, 2006.
- PURDOM-DICKINSON, S.E. et al. Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants. **Molecular pharmacology**, v.72, p.1074-81, 2007.
- QUAN, N. In-depth conversation: Spectrum and kinetics of neuroimmune afferent pathways. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.40, p.1-8.
- KAMATA, H.; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signalling. **Cellular signalling**, v. 11, p.1-14, 1999.

- KAMASURA, T.; WAKABAYASHI, N.; SHIGEMURA, N.; HUANG, C.S.; MASUTANI, K.; TANAKA, Y.; NODA, K.; PENG, K.; TAKASHI, T.; BILLIAR, T.R.; OKUMURA, M.;
- KAWANO, H.; MASUKO, S. Region-specific projections from the subfornical organ to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 169, p.1227–1234, 2010.
- KOZAK, W.; CONN, C.A.; KLUGER, M.J. Lipopolysaccharide induces fever and depresses locomotor activity in unrestrained mice. **Am J Physiol**, v. 266, p. 125-135, 1994.
- KANAPP, L.T.; KLANNL, E. Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory. **J Neurosci Res**, v. 70, p1–7, 2002.
- KETTENMANN, H.; HANISH, U-K.; NODA, M.; VERKHRATSKY, A. Physiology of Microglia. **American Physiological Society**, v. 91, p.461- 553, 2010.
- KOBAYASHI, M. et al. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. **Molecular and cellular biology**. v.29, p.493-502, 2009.
- RANGEL-FRAUSTO, M. S.; PITTET, D.; COSTIGAN, M. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. **The Journal of the American Medical Association**. v. 273, p.117-123, 1995.
- REIS, A.; SPICKETT, C.M. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1818, p.2374–2387, 2012.
- ROCCA MA.; PRAVATÁ, E.; VALSASINA, P.; RADAELLI, M.; COLOMBO, B.; VACCHI, L.; GOBBI, C.; COMI, G.; FALINI, A.; FILIPPI, M. Hippocampal-DMN disconnectivity in MS is related to WM lesions and depression. **Hum Brain Mapp**. v.36, p.5051–63, 2015.
- ROCHA, CH.C.; NASCIMENTO, N.SJ.; ANGENDT, LH. Brain Oxidative Stress During Experimental Sepsis Is Attenuated by Simvastatin Administration. **Mol Neurobiol**. v.54,p. 7008-7018, 2016.
- ROTHWELL, N.J., HOPKINS, S.J. Cytokines and the nervous system II: actions and mech. **Review**, v.18, p. 130-136, 1995.
- SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **J Pharmacol Exp Ther**, v.360, p.201–205, 2017.
- SANKOWSKI, R.; MADER, S.; VALDÉS-FERRER, S. I. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 28, 2015.
- SCHULTZ, M. J.; VAN DER PLOEG T. Animal and human models for sepsis. **Ann Med**, v.34, p. 573-81, 2002.
- SEMMLER, A.; OKULLA, T.; SASTRE, M.; DUMITRESCU-OZIMEK, L.; HENEKA, M.T. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. **J Chem Neuroanat**, v. 30, p.144–57, 2005.

SEMMLER, A et al. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. **J Neuroinflammation**, v. 5, p. 38, 2008

SHARSHAR, T.; GRAY, F.; LORIN, G. et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centers triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. **Mechanisms of Disease**, v. 362, p. 1799–805.

SHARSHAR, T.; HOPKINSON, N.S; ORLIKOWSKI, D; ANNANE, D. Science review: The brain in sepsis-culprit and victim. **Crit Care**, v.9, p.37-44, 2005.

SHARSHAR, T; GRAY F *et al.* Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centers triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. **Lancet**, v. 362, P.1799-05, 2003.

SHIBATA, T et al. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 13568-13573, 2008.

SHATZ, C. J. MHC Class I: An unexpected role in neuronal plasticity. **Neuron**, v.64, p.40–5, 2009.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental physiology**, v.82, p.291-5, 1997.

SONNEVILLE, R. et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. **Ann Intensive Care**, v. 3, n. 1, p. 15, 2013.

SPRUNG, C.L.; PEDUZZI, P.N.; SHATNEY, C.H.; SCEIM, R.M.; WILSON, M.F.; SHEAGRAN, J.N.; HINSHAW, L.B. Impact of encephalopathy on mortality in the sepsis syndrome. The veterans administration systemic sepsis cooperative study group. **Crit Care Med**, v.18, p.8001-806, 1990.

STITT, J.T. Passage of immunomodulators across the blood–brain barrier. **Yale J. Biol. Med**, v. 63, p.121–131, 1990.

STREIT, WJ; CONDE, JR; FENDRICK, SE; FLANARY BE; MARIANI CL. Role of microglia in the central nervous system's immune response. **Neurol Res**, v. 27, p.685–91, 2005.

STEVENS, C.F.; WANG, Y. Reversal of long-term potentiation by inhibitors of heme-oxygenase. **Nature**, v.364, p.147–149, 1993.

STELLWAGEN, D.; MALENKA, R. C. Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . **Nature**, v. 440, n. 7087, p. 1054-9, 2006.

SHIH, A.Y.; JOHNSON, D.A.; WONG, G., KRAFT, A.D., JIANG, L., ERB, H., JOHNSON, J.A., MURPHY, T.H., 2003. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. **J. Neuroscience**. V.23, p.3394–3406, 2003.

SUN, Z.; CHIN, Y.E.; ZHANG, D.D. Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. **Mol. Cell. Biol.** v.29, p.2658-2672, 2009.

TOYODA, Y.; KENSLER, T.W.; NAKAO, A. Hydrogen gas reduce hyperoxic lung injury via the Nrf2 in vivo. **Am. J. Physiol lung Cell Mol Physiol**, v.304, p.646-656, 2013.

TACCONE, F.S; CASTANARES-ZAPATERO, D; PERES-BOTA, D; VINCENT J.L; BERRE, J; MELOT C. Cerebral autoregulation is influenced by carbon dioxide levels in patients with septic shock. **Neurocrit Care**, v.3, p.35–42, 2010.

THIMMULAPPA, R.K.; LEE, H.; RANGASAMY, T.; REDDY, S.P.; YAMOTO, M.; KENSLER, T.W.; BISWAL, S. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *The Journal of Clinical Investigation*, v 116, p.984-995, 2006.

VERMA, A.; HIRSCH, D.J.; GLATTI, C.E.; RONNETT, G.V.; SNYDER, S.H Carbon monoxide: a putative neural messenger. **Science**, v.259, p.381–384, 1993.

VIANNA, M. R. et al. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. **Learn Mem**, v. 7, n. 5, p. 333-40, 2000.

XIE K.; LIU, L.; YU, Y.; WANG, G. Hydrogen Gas Presents a Promising Therapeutic Strategy for Sepsis. **Bio Med**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

XIE, K.; YU, Y.; ZHANG, Z.; LIU, W.; PEI, Y.; XIONG, L.; HOU, L.; WANG, G. Hydrogen gas improves survival rate and organ damage in zymosan-induced generalized inflammation model. **Shock**, v.34, p.495-501, 2010.

XIE, K.; YU, Y.; PEI, Y.; HOU, L.; CHEN, S.; XIONG, L.; WANG, G. Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release. **Shock**, vol. 34, p.90-97, 2010.

XIE K., W. FU, W. Xing et al., Combination therapy with molecular hydrogen and hyperoxia in a murine model of polymicrobial sepsis. **Shock**, vol. 38, p.656-663, 2012

ZHENG, Y.; DUMING, Z. Molecular hydrogen therapy ameliorates organ damage induced by sepsis. **Hindawi**, v10, p.16-22, 2016.

ZHUO, M.; SMALL, S.A.; KANDEL, E.R.; HAWKINS, R.D Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. **Science**, v.260, p.1946–1950, 1993.

ZHOU, J.; CHEN Y.; HUANG G.-Q. et al., Hydrogen-rich saline reverses oxidative stress, cognitive impairment, and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. **Journal of Surgical Research**, vol. 178, p. 390–400, 2012.

ZHOU, H-X.; Han, B et al. Protective Effects of Hydrogen Gas on Experimental Acute Pancreatitis. **Plos one**, v.10, p.1-15, 2016.

WANG, J.; YI. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease that is the question. **Cancer Biol Ther**, v. 7, P. 1875-1884, 2008.

WANG, C.; LI, J.; LIU, Q.; YANG, R.; ZHANG, J. H.; CAO, Y.P.; SUN, X.J. Hydrogen-rich saline reduces oxidative stress and inflammation by inhibit of JNK and NF-kB activation in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v.491, p. 127–132, 2011.

WEIGAND, M. A. The systemic inflammatory response syndrome. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 455-475, 2004.

YU, B., HAILMAN.; WRIGHT, SD. Lipopolysaccharide binding and CD14 catalyze of phospholipids. **J.Clin.Invest**, v.99, p. 315-324, 1997.

Anexo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do Hidrogênio Molecular sobre a síntese de mediadores inflamatórios e comportamento em ratos submetidos ao choque séptico", registrada sob nº 2016.5.96.22.3, sob a responsabilidade de Aline Alves de Jesus e Evelin Capellari Câmio, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado "ad referendum" pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (CEUA-EERP/USP) em 23/03/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	23/03/2017 a 20/02/2018
Espécie/Linhagem/Raça	Wistar
Nº de animais	120
Peso/idade	250-300g / 02 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central

Ribeirão Preto, 23 de março de 2017.


 Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli
 Presidente da CEUA-EERP/USP