**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

LUÍS HENRIQUE ANGENENDT DA COSTA

**Participação da ativação microglial nas alterações endócrinas, neurológicas
e imunes durante a sepse**

RIBEIRÃO PRETO

2020

LUIS HENRIQUE ANGENENDT DA COSTA

Participação da ativação microglial nas alterações endócrinas, neurológicas e imunes durante a sepse

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Neurologia (Subárea:
Neurociências)

Orientadora: Prof.^a Dr^a Maria José Alves da Rocha

RIBEIRÃO PRETO

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Costa, Luis Henrique Angenendt da
Participação da ativação microglial nas alterações endócrinas, neurológicas e imunes durante a sepse/ Luis Henrique Angenendt da Costa; orientadora, Maria José Alves da Rocha. - 2020
81 f

Tese (Doutorado em Neurologia) - Programa de Pós-graduação em Neurologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

1. Neuroinflamação 2. Hipotálamo 3. Minociclina 4. Apoptose

Nome: COSTA, Luis Henrique Angenendt da

Título: Participação da ativação microglial nas alterações endócrinas, neurológicas e imunes durante a sepse

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, Rosana e Aldo

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Maria José Alves da Rocha (Majô) pela orientação, confiança, apoio e imensa contribuição para minha formação durante todos os anos em seu laboratório. Meu sincero obrigado!

Aos professores Tarek Sharshar e Fabrice Chrétien por terem aberto as portas do laboratório e permitido mais uma vez um estágio no Institut Pasteur. *Merci!*

Aos colegas de laboratório Nilton, Caíque e Maykon pelo convívio diário, partilha de ideias e angústias e ajuda nos experimentos.

Aos amigos da USP pelas resenhas, rolês e risadas diárias: Pati, Livia, Maurão e Bruna.

À Nadir pela amizade, auxílio técnico com os animais e pelo (santo) café.

Aos colegas de laboratório do Institut Pasteur pela recepção e ajuda, em especial à Gabi e Lena, que permitiram que o estágio fosse ainda mais exitoso.

Ao Danilo, pelo companheirismo e por me mostrar tantas coisas novas.

Aos amigos de sempre (Mônica, Pothó, Max, Diego), que mostram que o tempo e a distância em nada mudam a amizade.

Aos animais, que com suas vidas permitiram a realização desse trabalho.

À FAPESP (Processos 2016/07803-0 e 2017/25628-3) e CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que o desenvolvimento desta tese.

RESUMO

COSTA, L. H. A. **Participação da ativação microglial nas alterações endócrinas, neurológicas e imunes durante a sepse.** 2020. 81f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2020.

A sepse, inflamação sistêmica desencadeada por um agente infeccioso, produz um estado inflamatório no sistema nervoso central (SNC) que pode causar alterações autonômicas, cognitivas, comportamentais e endócrinas. A microglia, tipo celular residente do SNC com importante papel na regulação imune e sináptica local, está ativada em diversas regiões cerebrais durante a sepse, sugerindo sua participação na disfunção neuroendócrina observada nessa doença. Este trabalho teve como objetivos: (1) avaliar o papel da ativação microglial sobre os parâmetros neuroimunoendócrinos em animais sépticos e (2) investigar a modulação da ativação do núcleo paraventricular (PVN) durante a sepse. Para o primeiro objetivo, ratos Wistar receberam injeção intracerebroventricular de minociclina (100µg/animal), um inibidor da ativação microglial, logo antes da indução da sepse por ligadura e punção cecal (CLP- 10 furos, agulha 16G). Seis e 24 horas após a cirurgia foram analisados os parâmetros hormonais, as inflamações central e periférica e os marcadores de apoptose e de função sináptica no hipotálamo. Para o segundo objetivo, avaliou-se em camundongos a morfologia microglial e a ativação de projeções para o PVN durante a sepse através da injeção de um neurotraçador retrógrado (CTB) nesse núcleo. Seis ou 24 horas após a sepse induzida também por CLP (2 furos, agulha 21G) foi feita uma análise imuno-histoquímica para identificação da ativação neuronal, além de marcadores de inflamação. Os resultados mostraram que a sepse afeta diferentemente a secreção hormonal, dependendo da fase da doença: pode haver diminuição (ACTH, prolactina), aumento (corticosterona) ou resposta mista (vasopressina, ocitocina). Observamos também aumento da neuroinflamação e nos marcadores de apoptose. A administração de minociclina diminuiu a ativação microglial, a produção de mediadores inflamatórios e expressão de marcadores de morte celular, principalmente na fase tardia. Quanto aos parâmetros endócrinos, após 6 horas de sepse a inibição microglial diminuiu os níveis plasmáticos de ocitocina e aumentou os de corticosterona e vasopressina, enquanto que na fase tardia diminuiu os de ocitocina e aumentou os de ACTH e corticosterona. Os níveis de prolactina não foram afetados pela administração de minociclina. Foram observadas alterações na morfologia de células microgliais no PVN de animais sépticos, além de diminuição da ativação de neurônios produtores de AVP e OT na fase tardia da sepse. Mostramos ainda que diferentes regiões encefálicas que se projetam para o PVN estão ativadas na sepse, potencialmente modulando sua atividade. Fonte de importantes eferências para o PVN durante a sepse, o órgão subfornical (SFO) também passa por processos neuroinflamatórios que pode influenciar sua atividade e controle endócrino. Nós concluímos que a regulação do sistema endócrino é amplamente afetada pela sepse, principalmente através da ação dos mediadores inflamatórios produzidos central e periféricamente. A ativação microglial tem importância nesse processo, afetando distintamente a secreção dos diferentes hormônios.

Palavras chave: neuroinflamação; hipotálamo; minociclina; apoptose

ABSTRACT

COSTA, L. H. A. **Participation of microglial activation in endocrine, neurologic and immune alterations during sepsis.** 2020. 81f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2020.

Sepsis, a systemic inflammation triggered by an infectious agent, produces an inflammatory state in the central nervous system (CNS) that may cause autonomic, cognitive, behavioral and endocrine changes. Microglia, a resident cell type of the CNS with an important role in local immune and synaptic regulation, is activated in several brain regions during sepsis, suggesting its participation in the neuroendocrine dysfunction observed in this disease. This study aimed to: (1) evaluate the role of microglial activation on neuroimmunoendocrine parameters in septic animals and (2) investigate the modulation of paraventricular nucleus (PVN) activation during sepsis. For the first objective, Wistar rats received intracerebroventricular injection of minocycline (100µg / animal), an inhibitor of microglial activation, just before sepsis induction by ligation and cecal puncture (CLP-10 holes, 16G needle). Six and 24 hours after surgery we analyzed the hormonal parameters, central and peripheral inflammation and markers of apoptosis and synaptic function in the hypothalamus. For the second objective, microglial morphology and activation of projections to the PVN during sepsis were analyzed in mice by injecting a retrograde neurotracer (CTB) into this nucleus. Six or 24 hours after sepsis also induced by CLP (2 holes, 21G needle) an immunohistochemical analysis was performed to identify neuronal activation, in addition to inflammation markers. The results showed that sepsis differently affects hormonal secretion, depending on the stage of the disease: there may be a decrease (ACTH, prolactin), an increase (corticosterone) or a mixed response (vasopressin, oxytocin). We observed an increase in neuroinflammation and in apoptosis markers. The administration of minocycline decreased microglial activation, the production of inflammatory mediators and expression of cell death markers, especially in the late phase. Regarding the endocrine parameters, after 6 hours of sepsis, microglial inhibition decreased plasma levels of oxytocin and increased corticosterone and vasopressin, while in the late phase it decreased oxytocin and increased ACTH and corticosterone. Prolactin levels were not affected by minocycline administration. Changes in microglial cell morphology were observed in the PVN of septic animals, in addition to decreased activation of AVP and OT-producing neurons in the late stage of sepsis. We also showed that different brain regions that project to the PVN are activated in sepsis, potentially modulating its activity. A source of important efferences to the PVN during sepsis, the subfornical organ (SFO) also undergoes a neuroinflammatory processes that may influence its activity and endocrine control. We conclude that the regulation of the endocrine system is largely affected by sepsis, mainly through the action of inflammatory mediators produced central and peripherally. Microglial activation is important in this process, distinctly affecting the secretion of different hormones.

Keywords: neuroinflammation; hypothalamus; minocycline; apoptosis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Epidemiologia da sepse	12
1.2 Definição de Sepse	12
1.3 Fisiopatologia	13
1.4 Disfunção neurológica na sepse	14
1.5 Alterações neuroendócrinas durante a sepse	16
1.5.1 Alterações do eixo hipotálamo-neuro-hipófise.....	17
1.5.2 Alterações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA)	18
1.5.3 Alterações do eixo lactotrófico.....	18
1.6 Microglia e sepse	19
2. OBJETIVO	21
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Objetivo 1	24
3.1.1 Animais.....	24
3.1.2 Estereotaxia para canulação do ventrículo lateral	24
3.1.3 Anestesia e Indução da sepse por “ligadura e punção cecal” (CLP)	24
3.1.4 Tratamento com minociclina	25
3.1.5 Planejamento experimental.....	25
3.1.6 Preparo e coleta do tecido cerebral.....	25
3.1.7 Imuno-histoquímica.....	26
3.1.8 Western blot.....	26
3.1.9 Dosagem de hormônios e citocinas	27
3.1.10 Dosagem de óxido nítrico.....	27

3.1.11 Análise Estatística	28
3.2 Objetivo 2	28
3.2.1 Animais.....	28
3.2.2 Planejamento experimental.....	29
3.2.3 Indução da sepse.....	29
3.2.4 Preparo do tecido	29
3.2.5 Análise morfológica microglial	29
3.2.6 Imunofluorescência	30
3.2.7 Neurotraçamento	31
3.2.8 Estatística.....	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Objetivo 1	33
4.1.1 Alterações gliais durante a sepse	33
4.1.2 Alterações endócrinas.....	36
4.1.2.1 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal	36
4.1.2.2 Hormônios neurohipofisários	37
4.1.2.3 Prolactina.....	38
4.1.3 Neuroinflamação hipotalâmica.....	38
4.1.4 Inflamação sistêmica	40
4.1.5 Apoptose.....	41
4.1.6 Sinaptofisina	42
4.1.7 Sobrevida.....	43
4.2 Objetivo 2	44
4.2.1 Morfologia microglial no PVN	44
4.2.2 Ativação neuronal no PVN.....	45
4.2.3 Eventos neuroimunes no SFO	47
5. DISCUSSÃO	51

6. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da sepse

Apesar dos recentes e constantes avanços na pesquisa experimental e clínica, a sepse continua sendo um grande desafio em todo o mundo, sendo uma das principais causas de internação em populações adultas e pediátricas (FLEISCHMANN-STRUZEK et al., 2018). Nos Estados Unidos cerca de 1,7 milhão de adultos são diagnosticados com sepse anualmente e que potencialmente leva a mais de 250.000 mortes (RHEE et al., 2017; RHEE et al., 2019), além de gerar altos gastos (cerca de U\$3000 por dia no caso de pacientes em choque séptico) (PAOLI et al., 2018). Isso mostra que mesmo em países desenvolvidos a sepse ainda é um grande problema de saúde pública.

No Brasil a mortalidade é ainda maior, variando entre 46% e 55%, mas que chega a quase 65% em pacientes sépticos internados em unidades de terapia intensiva (UTI) (MACHADO et al., 2017; QUINTANO NEIRA et al., 2018). Existe ainda uma discrepância clara entre hospitais privados e públicos, sendo que nos primeiros a letalidade e o tempo de internação dos pacientes são menores (QUINTANO NEIRA et al., 2018).

Em uma recente iniciativa de incentivo, a Organização Mundial da Saúde passou a incluir a sepse como uma das prioridades na saúde mundial, estimulando “*promover a pesquisa com alvo em formas inovadoras de diagnosticar e tratar a sepse durante toda a vida, incluindo pesquisa de novos antimicrobianos e medicamentos alternativos, rápidos testes diagnósticos, vacinas e outras importantes tecnologias, intervenções e tratamentos*” (OMS, 2017).

1.2 Definição de Sepse

A primeira proposta de padronização da definição de sepse ocorreu somente em 1991, durante uma conferência do *American College of Chest Physicians* e da *Society of Critical Care Medicine* (BONE et al., 1992). Nesse consenso foi proposta que sepse seria a resposta sistêmica a uma infecção, manifestada por um ou dois sinais/ sintomas de SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica): (1) temperatura corporal $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$; (2) frequência cardíaca >90 batimentos por minuto; (3) frequência respiratória >20 movimentos por minuto ou $\text{PaCO}_2 <32\text{mmHg}$ e (4) contagem de células sanguíneas brancas >12000 células/ mm^3 , <4000 células/ mm^3 ou $>10\%$ de células imaturas (bastonetes). Além disso, foram propostas nomenclaturas para os diferentes graus de severidade da doença. Quando associada à hipoperfusão, hipotensão ou disfunção de órgãos é denominada sepse grave. Quando a queda

na pressão arterial se torna persistente mesmo com a reposição adequada de fluidos, sendo necessário o uso de vasopressores, tem-se o quadro de choque séptico.

Dez anos mais tarde, em uma tentativa de aproximar as definições de sepse da prática clínica, as terminologias foram revisadas em um novo consenso (LEVY et al., 2003). Foi considerado que o uso dos critérios diagnósticos de SIRS eram inespecíficos e sugeriram uma lista expandida de sinais e sintomas que melhor indicariam uma resposta à infecção, incluindo parâmetros inflamatórios, hemodinâmicos e de perfusão tecidual no reconhecimento da sepse. Os conceitos de sepse grave e choque séptico permaneceram inalterados.

A mais recente atualização dos conceitos de sepse ocorreu em 2016 (SINGER et al., 2016). A crítica em relação à não-especificidade do uso dos critérios de SIRS resultou na abolição de seu uso no diagnóstico de sepse. Passou-se a diferenciar uma infecção da sepse ao considerar esta como uma resposta desregulada do hospedeiro e associada à disfunção orgânica. Clinicamente, a disfunção de órgãos passou a ser definida como uma mudança aguda de 2 pontos ou mais no SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*), um escore de amplo uso clínico e que facilitaria a aplicação prática. Os especialistas do consenso consideraram que o uso do termo sepse grave passou a ser redundante, uma vez que o novo conceito de sepse já passou a incluir a disfunção de órgãos, sendo assim abolido seu uso. O choque séptico passou a ser definido como um subconjunto da sepse onde as alterações circulatórias e de metabolismo celular são profundas o suficiente para aumentar a mortalidade. Clinicamente é caracterizada pela sepse com hipotensão persistente e sendo necessária a administração de vasopressores para manter a pressão arterial média ≥ 65 mmHg, além de níveis séricos de lactato > 2 mmol/L mesmo com reposição volêmica adequada. O consenso traz ainda uma nova ferramenta para identificação rápida de pacientes fora das UTIs e que estariam em maior risco de desfecho clínico desfavorável, o qSOFA (*quick SOFA*). O qSOFA seria um instrumento de triagem e indicação de alerta, sendo positivo quando o paciente apresentar ao menos dois dos critérios: (1) frequência respiratória ≥ 22 movimentos/ minuto, (2) alteração do estado mental e (3) pressão arterial sistólica ≤ 100 mmHg.

1.3 Fisiopatologia

A sepse possui fisiopatologia complexa devido a sua condição multifatorial resultante da interação de componentes infecciosos, imunológicos, endócrinos, hemodinâmicos, cardiovasculares e até genéticos (HOLMES et al., 2003; TRENTZSCH et al., 2003; DE MAIO et al., 2005). O ponto inicial do processo patológico, porém, é a resposta inflamatória originada

da interação do sistema imune com o agente infeccioso. Esses agentes (mais comumente bactérias, mas também vírus e fungos) são reconhecidos inicialmente por células do sistema imune inato, principalmente macrófagos/ monócitos e neutrófilos, que desencadeiam a cascata de produção de mediadores inflamatórios (LEWIS et al., 2012).

Através de receptores específicos na superfície celular (receptores do tipo *toll*, por exemplo) ou no citoplasma (receptores do tipo NOD), essas células detectam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, que incluem o lipopolissacarídeo [LPS]) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs, como HMGB1, ATP, etc). Isto leva à ativação de diferentes cascatas que culminam na produção e liberação concomitante de interleucinas pró- (IL-1 β , IL-6, IL-18) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), óxido nítrico (NO), interferon-gama (INF- γ), prostaglandinas, leucotrienos, fator de agregação plaquetária (PAF), dentre outros (JACOBI, 2002; REMICK, 2007).

Apesar de necessária para combater a infecção, a resposta inflamatória se torna exacerbada durante a sepse, sendo deletéria ao organismo. Ocorrem profundas alterações endoteliais como o aumento da adesão de neutrófilos, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (LEWIS et al., 2012; SALOMAO et al., 2019). Adicionalmente, esse dano vascular induz a produção de fator tecidual, que ativa a cascata de coagulação. Células imunes, principalmente macrófagos e neutrófilos, também produzem fator tecidual durante uma situação inflamatória, potencializando ainda mais a resposta coagulatória (REMICK, 2007). Esse processo pode levar à formação de microtrombos e a um quadro de coagulação intravascular disseminada, diminuindo o suporte de oxigênio e de nutrientes a diversos órgãos e comprometendo a função dos mesmos.

1.4 Disfunção neurológica na sepse

O comprometimento do sistema nervoso central (CNS) é uma das primeiras e principais manifestações da sepse, originando um quadro denominado encefalopatia associada à sepse (SAE) (GOFTON; YOUNG, 2012). A SAE caracteriza-se por uma deterioração do estado mental e de diversas funções cerebrais, com flutuações na consciência que variam do *delirium* ao coma, podendo levar a alterações persistentes naqueles que sobrevivem (MICHELS et al., 2015a; CALSAVARA et al., 2018). A fisiopatologia desse comprometimento da função neurológica é complexa e envolve fatores periféricos e locais no seu desenvolvimento.

A barreira hematoencefálica (BHE) tem papel importante no desenvolvimento da SAE. Em situações fisiológicas essa barreira exerce uma regulação extremamente rigorosa da comunicação entre a microcirculação e o tecido nervoso, através da interação de células endoteliais, pericitos e processos astrocitários (MCCAFFREY; DAVIS, 2012). Durante a inflamação sistêmica diferentes agentes inflamatórios, principalmente citocinas e mesmo endotoxinas, perturbam essa fina regulação, causando diminuição das moléculas de adesão (*tight junctions*) entre as células endoteliais e comprometimento da comunicação astro-vascular (KUPERBERG; WADGAONKAR, 2017). Esses processos levam a um aumento da permeabilidade da BHE, permitindo que mediadores inflamatórios circulantes ganhem acesso ao parênquima nervoso e amplifiquem a neuroinflamação. Vale ressaltar que existem regiões cerebrais desprovidas de BHE, os chamados órgãos circumventriculares (CVOs). Essas regiões desempenham papel na sinalização cerebral durante a sepse mesmo antes do rompimento da BHE, visto que permitem o livre acesso de citocinas ao tecido nervoso, ativando diversas vias de sinalização que se comunicam com áreas relacionadas a funções cardiovasculares, endócrinas e comportamentais (MIYATA, 2015).

A disfunção endotelial local compromete o fluxo sanguíneo cerebral normal durante a sepse, levando processos isquêmicos. Estudos clínicos de imagem (POLITO et al., 2013) e *post mortem* (SHARSHAR et al., 2003) revelaram que pacientes sépticos de fato desenvolvem áreas de isquemia em diversas regiões cerebrais, principalmente em áreas relacionadas ao controle autonômico. A presença do processo isquêmico nesses pacientes está associada a uma maior mortalidade e disfunção neurológica (POLITO et al., 2013) e parece estar relacionada à produção de NO através da isoforma induzível da óxido nítrico-sintase (iNOS) (SHARSHAR et al., 2003).

Mediadores inflamatórios produzidos centralmente ou vindos da periferia podem também contribuir para a disfunção mitocondrial no CNS. O aumento da síntese de NO, mediada principalmente por iNOS, leva à produção de espécies reativas de oxigênio que agem diretamente no processo de respiração celular, interferindo em diferentes pontos da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e levando à menor geração de ATP (DAL-PIZZOL et al., 2010; BERG et al., 2011). Paralelamente, esses mesmos agentes inflamatórios causam morte celular que também pode contribuir para a disfunção cerebral. A via intrínseca ou mitocondrial de morte celular programada (apoptose) é iniciada após o estresse celular causado por espécies reativas de oxigênio. Nesse processo, proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bid) deslocam-se para a superfície da mitocôndria, onde estão localizadas proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl) (HOTCHKISS et al., 2003). A interação entre essas proteínas causa perturbações às funções

normais das proteínas anti-apoptóticas, levando à permeabilização da membrana mitocondrial externa (MESSARIS et al., 2004). Assim, ocorre a translocação de proteínas mitocondriais para o citosol, como o citocromo-c, que interage com outras proteínas (Apaf-1 e pró-caspase-9) formando o apoptossomo (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998; GUPTA, 2003). O apoptossomo culmina na clivagem e consequente ativação da caspase-3, uma caspase efetora que promove a condensação de cromatina, fragmentação do DNA e clivagem de outras proteínas celulares (PORTER; JANICKE, 1999).

Por fim, um terceiro componente envolvido na fisiopatologia da SAE é a alteração na neurotransmissão durante a sepse, com destaque para o sistema colinérgico. A transmissão mediada por acetilcolina (Ach) participa da regulação de diferentes funções cerebrais, principalmente relacionadas ao comportamento e funções autonômicas (PICCIOTTO et al., 2012). Em modelos experimentais de sepse, já foi demonstrado que ocorre uma diminuição da atividade da colina acetiltransferase (WILLARD et al., 1999), um indicador de integridade colinérgica, além de um aumento da atividade de acetilcolinesterase (SANTOS-JUNIOR et al., 2018), enzima que degrada Ach. Estes processos levam à diminuição da acetilcolina cerebral, um mecanismo que é em parte mediado pela ação de citocinas como IL-1 (RADA et al., 1991; LI et al., 2000). Além de comprometer a neurotransmissão, a diminuição de ação colinérgica central pode ainda contribuir para amplificar a neuroinflamação, uma vez que a ativação de receptores muscarínicos cerebrais tem efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (FRINCHI et al., 2019). Outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina e serotonina estão também diminuídos durante a sepse, principalmente na presença de encefalopatia (FREUND et al., 1985).

1.5 Alterações neuroendócrinas durante a sepse

O sistema neuroendócrino consiste basicamente no centro de controle neural da regulação, produção e liberação hormonal, especificamente no hipotálamo e na glândula hipófise. Sua função é essencialmente manter a homeostase geral, atuando diretamente no organismo ou levando à produção de hormônios secundários que controlam funções metabólicas, hemodinâmicas, reprodutivas, comportamentais, etc.

De modo geral, todos os parâmetros hormonais seguem uma cinética semelhante durante a sepse: durante a fase inicial (ou aguda) seus níveis plasmáticos encontram-se elevados e com a progressão da doença, numa fase tardia, os níveis se tornam basais novamente

(LANGOUCHE; VAN DEN BERGHE, 2006). Algumas das particularidades de síntese e liberação dos eixos neuroendócrinos alvo deste trabalho são detalhadas adiante.

1.5.1 Alterações do eixo hipotálamo-neuro-hipófise

O eixo hipotálamo-neurohipofisário consiste em neurônios cujos corpos celulares estão localizados nos núcleos supraópticos e paraventriculares do hipotálamo e que projetam seus axônios para a porção posterior da hipófise, a neuro-hipófise. Os neurônios produtores de vasopressina (AVP) assim como os de ocitocina (OT) estão presentes nesse sistema, onde são produzidos e transportados em pequenas vesículas até serem liberados em vasos sanguíneos próximos aos terminais axonais (GUTNICK; LEVKOWITZ, 2012).

A vasopressina está relacionada ao controle do balanço hidroeletrólítico, sendo liberada após situações em que ocorre o aumento de osmolalidade plasmática, hipotensão e hipovolemia (DUNN et al., 1973; KADEKARO et al., 1992). Ela age principalmente através da indução de canais de aquaporina do ducto coletor renal (via receptores de vasopressina tipo V2), na ativação de receptores do tipo V1a na musculatura lisa vascular, que leva à vasoconstrição, (FUJIWARA et al., 2012; PARK; KWON, 2015) e na adenohipófise encontramos receptores do tipo V1b, que potencializam a produção de ACTH. Outras funções periféricas incluem a participação na glicogenólise hepática, agregação plaquetária e coagulação sanguínea (CUNNINGHAM; SAWCHENKO, 1991). No sistema nervoso central age como neuromodulador no comportamento, memória, temperatura corporal e atividade cardíaca (STOOP, 2012).

As ações centrais da ocitocina são principalmente relacionadas à modulação do comportamento social, sexual e materno, além de regulação do sistema cardiovascular, termorregulação e osmorregulação (TOM; ASSINDER, 2010). Periféricamente está associada à vasodilatação, regulação osmótica renal, contração uterina durante o parto e ejeção de leite e na amamentação (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001; TOM; ASSINDER, 2010).

Durante a sepse já foi extensivamente demonstrado por nosso grupo que há um aumento das concentrações plasmáticas de vasopressina na fase aguda, enquanto que na fase tardia, apesar da hipotensão persistente, os níveis de AVP estão basais (CORRÊA et al., 2007; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009). Algumas hipóteses para a deficiência na secreção de AVP na fase tardia da sepse são: diminuição dos estoques neurohipofisários (SHARSHAR et al., 2002; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009), alteração dos reflexos autonômicos (HOLMES et al., 2001; PANCOTO et al., 2008), excessiva produção central de NO (SHARSHAR et al.,

2003; GIUSTI-PAIVA et al., 2005) e apoptose de neurônios vasopressinérgicos (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2013a; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2014; DA COSTA et al., 2017). A cinética da secreção de OT durante a sepse é idêntica à da vasopressina (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2010; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2013b).

1.5.2 Alterações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA)

O funcionamento do eixo HPA é fundamental na homeostasia corporal, principalmente no que se refere à adaptação ao estresse. Neurônios parvocelulares situados no PVN secretam CRH (*corticotropin-releasing hormone*) na eminência mediana e através da circulação portal estimularão corticotrofos na hipófise anterior a sintetizarem e liberarem ACTH (*adrenocorticotropic hormone*) na circulação, seguindo um ritmo circadiano. Este hormônio, por sua vez, terá como alvo a glândula adrenal, onde serão produzidos glicocorticoides, sendo o cortisol o principal em humanos e a corticosterona em roedores. (GONCHAROVA, 2013).

Infecções bacterianas e virais podem resultar na ativação do eixo HPA, principalmente através da ação de produtos bacterianos e de mediadores inflamatórios (WEBSTER; STERNBERG, 2004). Esta ativação pode ocorrer tanto a nível central, através da atividade direta ou indireta de células/ vias hipotalâmicas e hipofisárias, assim como diretamente na glândula adrenal (ANNANE, 2016). Os glicocorticoides têm notória ação anti-inflamatória, agindo sobre proteínas reguladoras de vias inflamatórias e fatores de transcrição dessas vias, como NF κ B (RHEN, 2005; BARNES, 2006).

Durante a sepse, além da interrupção do ritmo circadiano de liberação, há inicialmente um aumento na secreção dos hormônios do eixo, seguido de um posterior retorno aos seus níveis basais (CARLSON et al., 2006; MAXIME et al., 2007; FLIERL et al., 2011; KANCZKOWSKI et al., 2013). A ação de citocinas, o aumento da produção hipotalâmica de óxido nítrico e a morte celular podem estar envolvidos nesse processo patológico (SHARSHAR et al., 2003; MAXIME et al., 2007; POLITO et al., 2011).

1.5.3 Alterações do eixo lactotrófico

A prolactina também é produzida na hipófise anterior, em células denominadas lactotrofos. Diferentemente de todos os outros hormônios hipofisários, sua regulação hipotalâmica é essencialmente inibitória através da ação da dopamina produzida no núcleo arqueado e que direta ou indiretamente chega à circulação portal e à adenohipófise

(GRATTAN, 2015). Além de importante papel no comportamento e produção de leite em mulheres, a prolactina tem influência sobre o sistema imune, induzindo proliferação de diversos tipos celulares e secreção de citocinas e quimiocinas (COSTANZA et al., 2015). De fato, o tratamento de animais sépticos com prolactina aumenta a mortalidade, associada à apoptose de esplenócitos e modificação na expressão de IL-2 e IFN- γ (OBERBECK et al., 2003).

Estudos clínicos mostram que tanto em homens como em mulheres com sepse há um aumento dos níveis circulantes de prolactina, assim como a perda de sua secreção pulsátil (DENNHARDT et al., 1989; LANGOUCHE; VAN DEN BERGHE, 2006). Níveis elevados de prolactina estão ainda relacionados com maior presença de delírio em pacientes sépticos (NGUYEN et al., 2016).

1.6 Microglia e sepse

Consideradas células imunes residentes do sistema nervoso central, as células microgliais possuem diferentes funções na manutenção da homeostasia cerebral, bem como em processos patológicos.

A microglia possui origem embrionária distinta das outras células cerebrais e também diferente dos macrófagos, células com as quais possui grande semelhança na morfologia e função. Em roedores, tem sua origem em progenitores eritromielóides no saco vitelino, que se espalham através da corrente sanguínea fetal para os órgãos em desenvolvimento que são então colonizados por essas células que se assemelham a macrófagos primitivos (HOEFFEL; GINHOUX, 2018). Uma vez que se instalam no sistema nervoso central, essas células passam por diferentes etapas de desenvolvimento até se tornarem uma microglia madura, num processo que se finaliza somente no período pós-natal, em que possuirão uma longa vida e serão autorenovadoras (VOET et al., 2019). Apesar da grande similaridade fenotípica, os macrófagos tem origem embrionária mais tardia, originados de células tronco hematopoiéticas no fígado fetal (HOEFFEL; GINHOUX, 2018). Após o nascimento, a produção dessas células imunes migra para a medula óssea, onde a geração de monócitos circulantes na corrente sanguínea dará origem a populações de macrófagos residentes em diferentes tecidos (THERET et al., 2019).

Na ausência de um estímulo patológico, as células microgliais tem diferentes funções no sistema nervoso central: regulação da neurogênese através da remoção de células progenitoras neurais apoptóticas (CUNNINGHAM et al., 2013); fagocitose de sinapses neuronais fracas ou disfuncionais (SCHAFER et al., 2012; JI et al., 2013); suporte neuronal

através da liberação de fatores tróficos (UENO et al., 2013); eliminação de células mortas e debris em todo o SNC (TAKAHASHI et al., 2005), etc.

Porém, durante um processo patológico como a sepse a microglia tem papel fundamental na resposta imune central e neuroinflamação. Como foi descrito anteriormente, a produção de mediadores inflamatórios na circulação durante a sepse leva ao aumento da permeabilidade da BHE, expondo o parênquima cerebral a esses mediadores. A exposição das células microgliais a esses mediadores promove rápida mudança em sua função e morfologia, passando de um estado de vigilância e manutenção para um estado ativo e inflamatório (KETTENMANN et al., 2011). Inúmeros estudos *in vivo* e *in vitro* já demonstraram que IL-1 β , TNF- α e LPS, por exemplo, induzem a produção de mais agentes inflamatórios pela microglia, criando um processo de auto ativação e consequente amplificação da neuroinflamação (KUNO et al., 2005; KAUSHIK et al., 2013; LIVELY; SCHLICHTER, 2018).

A sepse induz ativação microglial em diversas regiões cerebrais, como hipocampo (MORAES et al., 2014; ZHANG et al., 2017), hipotálamo (SANTOS-JUNIOR et al., 2018), tronco encefálico (AMORIM et al., 2019) e córtex (HOOGLAND et al., 2018). Essa ativação, associada ao aumento da neuroinflamação, induz alterações cognitivas e comportamentais em animais durante a fase aguda da doença, assim como em sobreviventes à sepse (MICHELS et al., 2015b). O impacto da ativação microglial sobre a regulação neuroendócrina durante a sepse é desconhecido.

A ação neuroinflamatória da ativação microglial pode ocorrer com a participação de outras células da glia, em especial os astrócitos. Essas células atuam na regulação sináptica através do controle dos níveis de glutamato e da liberação de gliotransmissores (ARAQUE et al., 1999). Durante a sepse, a ação conjunta de LPS e IFN- γ aumenta a síntese de iNOS e diminui a recaptação de glutamato em astrócitos (KORCOK et al., 2002). O aumento desse neurotransmissor pode originar um processo de excitotoxicidade, sendo prejudicial à função neuronal (DONG et al., 2009). Os astrócitos também estão envolvidos na manutenção da integridade da BHE (CABEZAS et al., 2014; KUBOTERA et al., 2019). IL-1 pode levar à produção de proteínas astrocitárias (VEGFA e TYMP) que estão relacionadas à quebra da BHE durante o processo inflamatório (CHAPOULY et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a participação da ativação microglial nas alterações endócrinas, neurológicas e imunes durante a sepse.

2.2 Objetivos específicos

1) Estudar o papel da ativação microglial sobre os parâmetros neuroimunoendócrinos em **ratos** sépticos avaliando:

- o efeito da inibição da ativação microglial sobre as alterações imunes e apoptóticas no hipotálamo durante a sepse;
- o efeito da inibição da ativação microglial sobre os parâmetros hormonais durante a sepse;
- o efeito da inibição da ativação microglial sobre a regulação sináptica hipotalâmica durante a sepse;

2) investigar a modulação da ativação do núcleo paraventricular (PVN) em **camundongos** sépticos analisando:

- a morfologia microglial no núcleo paraventricular de camundongos sépticos;
- a ativação neuronal do núcleo subfornical (SFO) que envia aferências relevantes para ativação do PVN durante a sepse;
- os parâmetros neuroinflamatórios do SFO durante a sepse;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Objetivo 1: Estudar o papel da ativação microglial sobre os parâmetros neuroimunoendócrinos em ratos sépticos

3.1.1 Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar ou Hannover adultos, de peso corporal entre 300-350 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo *Campus* de Ribeirão Preto, ambientados em gaiolas coletivas (cinco animais por gaiola) no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos em fotoperíodo de 12/12 horas, em temperatura de $(25 \pm 2^\circ\text{C})$, com livre acesso à água e dieta comercial balanceada (Nuvilab CR-1 Autoclavável, NUVITAL Nutrientes S/A). Os procedimentos realizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo - *Campus* de Ribeirão Preto (CEUA 2016.1.120.58.5).

3.1.2 Estereotaxia para canulação do ventrículo lateral

Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura Cetamina 5% (50mg/kg) e Xilazina 2% (10mg/kg) e colocados no aparelho estereotático. Foi injetada lidocaína (20mg/kg) no tecido subcutâneo da região sagital para vasoconstrição local, onde foi feita uma incisão de 1cm de extensão ao longo dessa mesma sutura. Uma cânula (28G, 14mm) foi introduzida para atingir o ventrículo lateral direito tendo como referência o bregma e as seguintes coordenadas: anterior -1mm; lateral -1,6mm; e dorsal -3,2 à -3,6mm. A cânula foi fixada ao osso utilizando acrílico dentário, após a fixação de dois parafusos no crânio. Esta cânula foi utilizada como guia para a injeção intracerebroventricular da droga. Após a cirurgia, os animais receberam Pentabiótico de pequeno porte (1ml/kg) e Aplonal (1mg/kg), como antibiótico e analgésico/anti-inflamatório, respectivamente. Os animais foram deixados em recuperação por 5 a 7 dias antes de serem utilizados para o experimento. Animais que possuíam a cânula obstruída no momento da injeção foram descartados.

3.1.3 Anestesia e Indução da sepse por “ligadura e punção cecal” (CLP)

Após estarem devidamente anestesiados com injeção intraperitoneal de tribromoetanol (TBE) 2,5% (Sigma-Aldrich) em solução salina (25mg/0,1kg), os animais foram submetidos à

incisão mediana de 2 cm no abdômen seguido de exposição do ceco e obstrução (ligadura parcial) da válvula íleocecal. Posteriormente, o ceco foi perfurado com 10 furos com agulha de calibre 16G. Após verificação do extravasamento de fezes do ceco, este foi novamente introduzido na cavidade abdominal. O fechamento da cavidade abdominal foi realizado em dois planos de sutura (camada muscular e tecido cutâneo) com pontos separados. Solução salina normal foi aplicada via subcutânea como líquido de reanimação (20mL/Kg).

3.1.4 Tratamento com minociclina

O Hidroclorato de Minociclina (Sigma-Aldrich) é uma tetraciclina sintética de segunda geração que tem sido utilizado como potente inibidor da ativação microglial, sem efeitos diretos sobre astrócitos, oligodendrócitos ou neurônios (TIKKA et al., 2001; SHAN et al., 2007). A droga foi injetada intracerebroventricularmente na dose de 100µg por animal, num volume de 5µl. Esta dose foi baseada em estudo prévio também utilizando ratos em um modelo de inflamação periférica (RIAZI et al., 2008). Animais controle receberam injeção do mesmo volume do veículo. A minociclina foi sempre preparada diariamente pouco antes de ser utilizada no experimento.

3.1.5 Planejamento experimental

Os animais submetidos à sepse por CLP receberam injeção intracerebroventricular (icv) de minociclina (100µg) ou do veículo imediatamente antes da cirurgia. Passadas 6 e 24 horas foram decapitados para coleta de sangue e encéfalo. Foram realizadas dosagens plasmáticas hormonais, de citocinas e óxido nítrico. Do encéfalo foi removido o hipotálamo para avaliação da expressão de marcadores envolvidos na neuroinflamação, neurotransmissão e apoptose. Um segundo grupo foi perfundido e cérebro destinado à análise imuno-histoquímica. Um outro grupo teve a sobrevida avaliada por 48 horas.

3.1.6 Preparo e coleta do tecido cerebral

Os animais profundamente anestesiados com TBE 2,5% foram perfundidos 6 e 24 horas após o estímulo. Para a perfusão foi feita uma incisão na região torácica do rato e, após a visualização do coração, uma agulha de ponta romba conectada a uma bomba peristáltica foi introduzida no ápice do ventrículo esquerdo até a saída da aorta. Em seguida, um corte foi feito

no átrio direito para permitir a saída de sangue e líquidos. Para a perfusão de cada animal foram utilizados 300ml de solução de PBS (0,01M, pH 7,4) seguido por 300ml de solução de paraformaldeído a 4% (PFA 4%) numa velocidade de infusão de 15 ml/min. Após o fim da perfusão os cérebros foram removidos e pós-fixados com o mesmo fixador por 4 horas e posteriormente imersos em solução de sacarose 30% em PBS por 3 dias.

3.1.7 Imuno-histoquímica

O tecido fixado foi seccionado em criostato (Microm HM-505-E) em secções de 30µm contendo os núcleos supraóptico e paraventricular. As secções foram inicialmente lavadas com PBS (0,01M - pH 7,4) por 15 minutos. A exposição de antígeno foi feita em tampão citrato 10mM, pH 6,0 a 70°C por 30 minutos, seguido do bloqueio das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio (1% em PBS) durante 30 minutos. Após lavagem com PBS por 15 minutos, os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados durante 1 hora com uma solução contendo soro normal de cabra (NGS) (5%) e Triton X-100 (0,3%) diluídos em PBS. Em seguida, sem lavagem, mas retirando o excesso de solução de bloqueio, as secções foram incubadas por 24h a 4°C com anticorpo específico para IBA-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*/ 1:1000, WAKO). Após nova lavagem, os cortes foram incubados durante 90 min à temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-*rabbit* biotinilado (Vectastain® Elite® ABC kit) diluídos a 1:400 em PBS contendo 1% de BSA, 1% NGS e 0,3% de Triton X-100. Após lavagem em PBS, as secções foram incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase durante 30 min (ABC, Vectastain) e mais uma vez lavadas em PBS antes da incubação com 0,05% de 3-3'-diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio a 0,015%. Finalmente, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas e cobertas com lamínulas (Knittel glass, 24 x 60 mm) usando meio de montagem apropriado (Entellan, Merck).

3.1.8 Western blot

Após dissecação, as amostras de hipotálamo foram homogeneizadas por ultrassom em tampão RIPA (Sigma-Aldrich) com 10% de mix de inibidores de protease (Sigma-Aldrich) diluído 1:10 e 0,5% de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF, Sigma-Aldrich) 200mM em metanol. Após agitação em gelo por 2 horas, as amostras foram centrifugadas a 3500xg por 20 min a 4 °C para coleta do sobrenadante. A quantidade de proteína total de cada amostra foi determinada a 592nm usando ensaio com ácido bicinonínico (BCA) de acordo com as

instruções do fabricante (Pierce BCA *protein assay kit*). Quantidades iguais de proteína total (40µg) foram diluídas em tampão Laemmli 2x (Sigma-Aldrich) e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (125V, 90 min). Marcadores de peso molecular de 10kDa a 245kDa (*Prism Ultra Protein Ladder*) foram aplicados em um dos poços do gel para visualização da separação e qualidade de transferência. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,45µm; Amersham) em sistema de tanque de *blotting* em tampão de transferência contendo 20% de metanol. A membrana foi incubada *overnight* a 4°C com anticorpos contra Iba-1 (Wako, 1:1000), GFAP (Millipore, 1:7000), BCL-2 (Santa Cruz, 1:1000), caspase-3 clivada (Cell Signalling, 1:500), PARP (Abcam, 1:1000), sinaptofisina (Cell Signalling, 1:3000), receptor de glicocorticoide (Abcam, 1:500) e β -actina (Santa Cruz, 1:2000). Anticorpos secundários conjugados com HRP (*horseradish peroxidase*) anti-rabbit (Abcam) e anti-mouse (Santa Cruz) foram diluídos 1:10000 em PBS-T com BSA 1% e as membranas foram incubadas com agitação durante 2h a 4°C. A detecção foi feita usando um kit de reação quimioluminescente (ECL prime, Amersham) e as bandas detectadas quantificadas pelo software ImageLab 5.2.1 (BioRad). Os resultados foram transformados em unidades arbitrárias de densidade óptica, corrigidos pela razão de β -actina (controle interno) e são expressos em porcentagem em relação ao controle.

3.1.9 Dosagem de hormônios e citocinas

As citocinas e hormônios plasmáticos foram quantificados através da técnica de ELISA (*Enzyme Linked Sorbent Assay*) de acordo com as instruções dos fabricantes dos kits. Os limites de detecção dos kits de citocinas (*rat DuoSet, R&D Systems*) foram: 62,5 a 4.000 pg/ml, 62,5 a 4.000 pg/ml, 125 a 8.000 pg/ml e 62,5 a 4.000 pg/ml para TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 respectivamente. Os kits de vasopressina e ocitocina (*Enzo Life Sciences*) tiveram limites de detecção de 4.10 - 1,000 pg/ml e 15.6 - 1,000 pg/ml, respectivamente. Os demais kits hormonais foram obtidos da *Cloud Clone Corp.*: ACTH (1.23-100pg/mL), corticosterona (1.23-100ng/mL) e prolactina (2.47-200ng/mL).

3.1.10 Dosagem de óxido nítrico

A quantificação dos valores de óxido nítrico no plasma foi avaliada indiretamente através dos valores de nitrato. Para isso, 50uL de plasma foram desproteinizados pela adição de 100uL de etanol absoluto, seguida pela agitação e incubação a -20°C por 30 minutos. As

amostras foram então centrifugadas por 5 minutos a 1000rpm e o sobrenadante utilizado para a dosagem de nitrato pela técnica de quimioluminescência. Após injeção em uma câmara de reação contendo um agente redutor (0,8% de VCL3 em HCL 1N à 90°C), que converte o nitrato em NO em quantidades equimolares, O NO formado é transposto para o interior da célula de detecção de quimioluminescência do analisador de NO (GE Analytical Instruments, Boulder, CO, EUA), onde reagirá com ozônio e levará à emissão de fótons que são detectados pelo fotomultiplicador e convertido em um sinal elétrico, o qual é transformado e analisado por um software apropriado.

3.1.11 Análise Estatística

Todos os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Em variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste estatístico ANOVA, enquanto as que não possuíam distribuição normal foram submetidas à análise não-paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido dos pós-testes adequados a cada análise- Tukey (paramétricos) e Dunn (não-paramétrico). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

3.2 Objetivo 2 –investigar a modulação da ativação do núcleo paraventricular (PVN) em camundongos sépticos

3.2.1 Animais

Para o estudo de morfologia microglial foram utilizados camundongos CX3CR1^{GFP/+} com idade entre 9 e 11 semanas. Nesses camundongos a expressão de GFP (*green fluorescent protein*) está sob controle do receptor fractalcina (CX3CR1) presente em células microgliais. Por ser constitutivamente expresso nessas células, é possível analisar sua morfologia sem a necessidade de técnicas imuno-histoquímicas que poderiam ser deletérias para o tecido. Nos demais experimentos foram utilizados camundongos C57BL/6 JRj obtidos comercialmente (JanvierLabs). Os animais foram mantidos em caixas coletivas com 5-7 animais cada, sob temperatura de $22 \pm 1,5$ °C, em um ambiente com humidade controlada, ciclo claro/ escuro de 12 horas e água e comida *ad libitum*. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética institucional do Institut Pasteur, Paris (dap180018).

3.2.2 Planejamento experimental

Um primeiro grupo de animais foi submetido à sepse por CLP e após 24 horas foram eutanasiados, perfundidos e o encéfalo foi destinado à análise da morfologia das células microgliais no núcleo paraventricular. Em um segundo grupo foram investigadas as conexões do PVN durante a fase aguda da sepse (6 horas após o CLP), através da injeção de um neurotraçador retrógrado neste núcleo e identificação de ativação neuronal através de imunofluorescência para *Fos*. Um último grupo de animais foi destinado à investigação do perfil de ativação de neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do PVN e das alterações neuroinflamatórias no órgão subfornical (SFO) durante a sepse.

3.2.3 Indução da sepse

Os animais foram anestesiados através de inalação de isoflurano (3% em 100% O₂), inicialmente em uma câmara de indução e logo após mantidos na mesa cirúrgica recebendo o anestésico através de uma máscara facial (1,5% em 100% O₂). Após uma incisão mediana o ceco foi exposto e ligado em seu terço distal com linha de sutura e então perfurado duas vezes com uma agulha de calibre 21G. Após extravasamento de fezes, o ceco foi retornado à cavidade peritoneal e a incisão foi suturada. Os animais receberam 1 ml de solução salina 0,9% juntamente com analgésico (buprenorfina 0,3ml/kg) imediatamente após a cirurgia e a cada 12 horas até a eutanásia.

3.2.4 Preparo do tecido

Após anestesia com uma mistura de cetamina (100mg/kg) e xilazina (20mg/kg) os animais foram perfundidos em bomba peristáltica com 75ml de PBS 0,1M seguidos pelo mesmo volume de paraformaldeído (PF) 4%. Após remoção do encéfalo, o mesmo foi imerso em solução de sacarose 30% a 4°C por 3 dias, congelado e cortado em secções coronais de 60µm em micrótomo. Os cortes foram mantidos em solução de PF 0,1% até serem utilizados.

3.2.5 Análise morfológica microglial

Para avaliação da morfologia das células microgliais no núcleo paraventricular (PVN) foram obtidas imagens utilizando um microscópio confocal (Leica SP5, objetiva de 40X) em um *z-stack* de 30µm do tecido, com um intervalo com no máximo 1,5µm entre os planos focais. Uma análise morfológica automática da morfologia microglial foi realizada através da “análise de esqueleto” (*skeleton analysis*), descrito com detalhes por Young e Morrison (2018).

Resumidamente as imagens obtidas no *z-stack* foram sobrepostas e após identificação das células microgliais estas foram individualmente analisadas (5 a 8 células por animal). Após identificar e limitar os processos celulares pertencente a cada célula analisada, converter as imagens para 8-bit e então para uma imagem binária, o *plugin Analyze Skeleton* do *software* ImageJ foi aplicado à imagem. Essa aplicação permite a análise de importante elementos da morfologia microglial, como o número de ramificações e de terminações de cada célula.

3.2.6 Imunofluorescência

Nos experimentos de dupla marcação de Fos e AVP/OT as secções coronais foram inicialmente lavadas com PBS (0,01M - pH 7,4) por 15 minutos. A exposição de antígeno foi feita em tampão citrato 10mM, pH 6,0 a 85°C por 30 minutos, seguida do bloqueio dos sítios de ligação inespecífica com albumina sérica bovina (BSA) 3% e Triton-X 100 0,5% por duas horas em temperatura ambiente. Em seguida, sem lavagem, os cortes foram incubados *overnight* a 4°C com anticorpo contra Fos (1:200, Merck), seguidos de incubação com anticorpo anti-coelho biotilado por três horas e estreptoavidina conjugada com fluoróforo (Cy3, Thermo Fisher Scientific) por mais duas horas. Após nova lavagem e novo bloqueio, houve incubação com um segundo anticorpo primário contra vasopressina (1:10.000, Peninsula Laboratories) ou ocitocina (1:10.000, Peninsula Laboratories) também por 24 horas, seguido de anticorpo secundário conjugado com fluoróforo diferente (DyLight 650, Thermo Fisher Scientific) por 2 horas em temperatura ambiente. Os cortes foram montados e cobertos com meio de montagem aquoso. As imagens do PVN foram obtidas em microscópio confocal (Leica SP5, objetiva de 40X) e o número de neurônios ativados foi quantificado manualmente. Um neurônio foi considerado ativado quando uma célula tinha seu citoplasma imunomarcado com AVP ou OT e seu núcleo era positivo para marcação de Fos.

Nas demais imunomarcações foi utilizado o mesmo protocolo de exposição antigênica e bloqueio com soro normal de cabra 10% por duas horas. Logo em seguida foram incubados com anticorpos primários contra Iba-1 (Wako, 1:400), NLRP3 (Abcam, 1:1000), laminina (Millipore, 1:100) e IL-1β (Abcam, 1:1000) por 48 horas a 4°C, sob agitação. Após vigorosa

lavagem com PBS foram incubados com anticorpos secundários apropriados conjugados com diferentes fluoróforos por duas horas em temperatura ambiente, sendo que nos 30 minutos finais foi adicionado DAPI à solução para marcação nuclear. Os cortes foram montados e cobertos com meio de montagem aquoso antes da obtenção de imagens em microscópio confocal (Leica SP5).

3.2.7 Neurotraçamento

A fim de verificar a conectividade do PVN durante o estágio inicial e mais ativado da sepse, nós utilizamos uma técnica de neurotraçamento associado à imunomarcção de Fos para verificar quais neurônios ativados no sistema nervoso central se projetam para o núcleo paraventricular. Após anestesia com cetamina (100mg/kg) e xilazina (20mg/kg), os camundongos C57BL/6 foram fixados em um aparelho estereotáxico e receberam injeção de 50µl de CTB (*Cholera Toxin Subunit B*), um traçador retrógrado, conjugado com AlexaFluor 594 no PVN (coordenadas: AP +0.7mm, ±0.2mm, DV -4.8mm a partir do bregma). Cinco dias após a injeção, os animais foram submetidos à sepse por CLP e após 6 horas foram perfundidos, o cérebro processado conforme descrito anteriormente e realizada uma imunofluorescência para Fos. Um neurônio foi considerado duplamente marcado quando a marcação para Fos (localização nuclear) é cercada de CTB (citoplasmático).

3.2.8 Estatística

Todos os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Os resultados da morfologia microglial e da ativação neuronal no PVN foram submetidos à análise estatística utilizando teste t não-pareado. Após confirmada a distribuição normal, na quantificação da ativação neuronal no SFO foi utilizado a teste estatístico *one-way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

4. RESULTADOS

4.1 Objetivo 1 Estudar o papel da ativação microglial sobre os parâmetros neuroimunoendócrinos em animais sépticos

4.1.1 Alterações gliais durante a sepse

A análise morfológica (Fig. 1 e 2) das células microgliais no SON e PVN indicou diferenças entre os grupos estudados. Enquanto nos animais controles essas células apresentam ramificações longas e finas, após 6 (Fig. 1b e 2b) ou 24 horas (Fig. 1d e 2d) do estímulo séptico os animais passaram a apresentar células com processos mais curtos e espessos. A injeção intracerebroventricular de minociclina nos animais sépticos impediu essa mudança na morfologia da micróglia (Fig. 1c, 1e, 2c e 2e). A quantificação da expressão de Iba-1 no hipotálamo confirmou os dados obtidos por imuno-histoquímica e revelou um aumento dessa proteína nos animais sépticos, que foi prevenida com a injeção de minociclina (Fig. 3a). A análise dos astrócitos, um segundo tipo de célula glial, foi feita através da quantificação de GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) por western blot. A sepse não foi capaz de promover mudanças na expressão dessa proteína no hipotálamo; também não foi observado nenhum efeito com a administração de minociclina (Fig 3b).

Figura 1- Fotomicrografias ilustrando imunorreatividade para Iba-1 em cortes coronais de núcleos paraventriculares de animais controle (a) ou sépticos após 6 (b) e 24 (d) de ligadura e perfuração cecal (CLP). À direita nos mesmos períodos de 6h (c) e 24h (e) os resultados nos núcleos de animais submetidos à CLP e injetados icv com minociclina (CLP+M). As imagens foram obtidas por microscópio óptico. Objetiva: 40x. Escala = 50µm.

Figura 2- Fotomicrografias ilustrando imunorreatividade para Iba-1 em secções coronais de núcleos supraópticos de animais controle (a) ou sépticos após 6 (b) e 24 (d) horas após ligadura e perfuração cecal (CLP). À direita nos mesmos períodos de 6h (c) e 24h (e) os resultados nos núcleos de animais submetidos à CLP e injetados icv com minociclina (CLP+M). As imagens foram obtidas por microscópio óptico. Objetiva: 40x. Escala = 50µm.

Figura 3: Expressão de Iba-1 (a) e GFAP (b) no hipotálamo de animais não manipulados ou submetidos à sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP -6 e 24h), tratados ou não com minociclina (M). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão (DP.) Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle. Número de animais por grupo: 6-9.

4.1.2 Alterações endócrinas

4.1.2.1 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

Nossos resultados mostraram que a sepse causou uma diminuição nos níveis plasmáticos de ACTH, tanto em 6 como 24 horas após o CLP e que a injeção central de minociclina aumentou os níveis desse hormônio em relação ao grupo séptico somente em 24 horas (Fig. 4a). A cinética da corticosterona foi diferente, com aumento progressivo dos níveis após a sepse. A inibição da ativação microglial causou um aumento ainda maior nos níveis desse hormônio nos dois *timepoints* analisados (Fig. 4b). A análise por *western blot* mostrou que houve um aumento da expressão de receptor de glicocorticoide nas duas fases da sepse e que não houve alterações desse perfil com o uso de minociclina (Fig. 4c).

Figura 4: Concentrações plasmáticas de ACTH (a) e corticosterrona (b) de animais não manipulados ou submetidos a sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP -6 e 24h), tratados ou não com minociclina (M). (c) representa a expressão de receptor de glicocorticoide (GR) no hipotálamo dos mesmos animais. As barras representam a média $\pm$ DP. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo séptico no mesmo *timepoint*. Número de animais por grupo: 6-10.

4.1.2.2 Hormônios neurohipofisários

O padrão de secreção tanto de vasopressina (Fig. 6a) como de ocitocina (Fig. 6b) durante a sepse seguiu a mesma cinética: houve um aumento dos níveis plasmáticos na fase inicial (6 horas), seguido de um retorno aos níveis basais após 24 horas. A inibição da ativação microglial promoveu alterações distintas nos dois hormônios. Enquanto a administração de minociclina aumentou ainda mais os níveis de AVP somente após 6 horas, sem alterar em 24 horas, a secreção de OT diminuiu na fase inicial e aumentou após 24 horas.

Figura 5: Concentrações plasmáticas de vasopressina (a) e ocitocina (b) de animais não manipulados (controle) ou submetidos à sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP -6 e 24h), tratados ou não com minociclina (M). As barras representam a média $\pm$ DP. Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo séptico, no mesmo *timepoint*. Número de animais por grupo: 6-10.

4.1.2.3 Prolactina

Durante todo o protocolo experimental os níveis plasmáticos de prolactina de animais sépticos estiveram diminuídos em relação aos animais controle. A administração de minociclina não alterou a secreção desse hormônio durante a sepse.

Figura 6: Concentrações plasmáticas de prolactina de animais controle ou submetidos à sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP -6 e 24h), tratados ou não com minociclina (M). As barras representam a média $\pm$ DP. Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle. Número de animais por grupo: 5-9.

4.1.3 Neuroinflamação hipotalâmica

Afim de avaliar o estado neuroinflamatório no hipotálamo durante a sepse, avaliamos a produção de citocinas e a expressão de fatores relacionados à inflamação nessa região (Fig 7).

Houve um aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (a), IL-6 (b) e TNF- α (c) e uma diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10 (d) no hipotálamo 24 horas após a sepse. Nesse mesmo período de 24h houve um aumento da expressão de NF κ B (e). A inibição da ativação microglial preveniu a diminuição de IL-10, enquanto impediu o aumento da secreção das demais citocinas, bem como da expressão de NF κ B.

Figura 7: Produção de citocinas (a-d) e expressão de NF κ B (e) no hipotálamo de animais não manipulados ou submetidos a sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP -6 e 24h), tratados ou não com minociclina (M). As barras representam a média $\pm$ DP. Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do pós-teste de Tukey (b, c, d) ou teste de Kruskal-Wallis e

pós-teste de Dunn (a, e). * = $p \leq 0,05$ comparado ao grupo naïve # = $p \leq 0,05$ comparado ao grupo 24h. Número de animais por grupo: 6-10

4.1.4 Inflamação sistêmica

Como esperado, os animais sépticos apresentaram aumento na produção de citocinas pró- (IL-1 β , IL-6, TNF- α)- e anti-inflamatórias (IL-10) plasmáticas, assim como de óxido nítrico, na fase aguda e tardia da doença, com exceção dos níveis de IL-6 que se encontraram em níveis fisiológicos após 24 horas (b). A administração icv de minociclina atenuou os níveis de IL-1 β em 6 horas (a) e de TNF- α (c) em 24 horas e aumentou IL-6 (b) na fase aguda. O uso dessa droga não alterou os valores de NO e IL-10 circulantes.

Figura 8: Produção de citocinas (a-d) e NO (e) no plasma de animais controle ou submetidos a sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP -6 e 24h), tratados ou não com minociclina (M). As barras representam a média $\pm$ DP. Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do pós-teste de Tukey (b, c, d) ou teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (a, e). * = $p \leq 0,05$ comparado ao grupo naive; # = $p \leq 0,05$ comparado ao séptico no mesmo *timepoint*; @ = $p \leq 0,05$ comparado ao grupo 6h. Número de animais por grupo: 6-10

4.1.5 Apoptose

A análise da expressão de proteínas envolvidas na morte celular programada mostrou que em 24 horas, mas não em 6 horas, há uma diminuição dos níveis de BCL-2 no hipotálamo

de animais sépticos, o que é prevenido com a administração de minociclina (Fig. 9a). Nesse mesmo período há um aumento na expressão de caspase-3 clivada (b) e de PARP clivada (c), o que também é inibido com o uso da droga.

Figura 9: Expressão de BCL-2 (a), caspase-3 clivada (b) e PARP clivada (c) no hipotálamo de animais não manipulados ou submetidos à sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP -6 e 24h), tratados ou não com minociclina (M). Os valores representam a porcentagem em relação ao grupo controle. As barras representam a média $\pm$ DP. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle. Número de animais por grupo: 5-8.

4.1.6 Sinaptofisina

A expressão de sinaptofisina no hipotálamo foi avaliada por *western blot*. Essa proteína teve sua expressão aumentada 6 horas após a indução da sepse por CLP, mas após 24 horas esse aumento foi abolido. A inibição da ativação microglial promoveu um aumento ainda maior de sua expressão em 6 horas, sem efeitos na fase tardia.

Figura 10: Expressão de sinaptofisina no hipotálamo de animais controle ou submetidos à sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP -6 e 24h), tratados ou não com minociclina (M). Os valores representam a porcentagem em relação ao grupo controle. As barras representam a média $\pm$ DP. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle; # $p \leq 0,05$ comparado ao séptico no mesmo *timepoint*. Número de animais por grupo: 5-8.

4.1.7 Sobrevida

Nosso modelo de sepse promoveu uma mortalidade de cerca de 60% nos animais após 24 horas, o que permaneceu após 48 horas. A inibição da ativação microglial não alterou a mortalidade nos animais (Fig. 11).

Figura 11: Taxa de sobrevivência de animais sépticos, tratados ou não com minociclina (M). Os resultados são expressos como porcentagem de sobrevivência. Número de animais por grupo: 10.

4.2 Objetivo 2: Investigar a modulação da ativação do núcleo paraventricular (PVN) em camundongos sépticos

4.2.1 Morfologia microglial no PVN

Após identificação das células individuais a serem analisadas (Fig. 12a), conversão para imagem binária (b) e “esqueletificação” (c) as imagens foram submetidas à análise pelo *plugin* que mostrou uma diminuição no número de ramificações (d) e de terminações (e) nas células microgliais em animais sépticos 24 horas após o CLP. Exemplos da morfologia dessas células nos diferentes grupos são mostradas na Fig. 12f.

Figura 12: Etapas da análise da morfologia microglial (a-c). Quantificação do número de ramificações (d) e de terminações (e) de células microgliais no PVN e imagens representativas dessas células (f). As barras representam a média ± DP. Para a análise estatística foi utilizado teste t não-pareado. * = $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle. Número de animais por grupo: 4.

4.2.2 Ativação neuronal no PVN

Utilizando técnica de imunofluorescência podemos avaliar a ativação de duas populações neuronais no núcleo paraventricular: neurônios magnocelulares produtores de vasopressina (Fig. 13a) e de ocitocina (Fig. 13b). Nota-se que houve uma expressiva diminuição da imunomarcagem para Fos (em vermelho) no grupo de animais 24 horas após o CLP. Quantificamos então a porcentagem de células AVP ou OT- positivas (em verde) que estavam ativadas e confirmamos que na fase tardia da sepse há uma diminuição estatisticamente significativa na porcentagem de neurônios ativados em relação à fase aguda (c, d).

Figura 13: (a-b) Fotomicrografias mostrando imunorreatividade para Fos (vermelho), vasopressina (a) ou ocitocina (b), em verde, em cortes coronais através do PVN de animais sépticos 6 e 24 horas após o CLP. As imagens foram obtidas em microscópio confocal. Objetiva: 40x. Escala = 50µm. (c-d) Porcentagem de neurônios vasopressinérgicos (c) e ocitocinérgicos (d) ativados no PVN durante a sepse. As barras representam a média $\pm$ DP. Para a análise estatística foi utilizado teste t não-pareado. * = $p \leq 0,05$ comparado ao grupo 6h. Número de animais por grupo: 4.

4.2.3 Eventos neuroimunes no SFO

Quanto à ativação neuronal, a imunofluorescência para *Fos* mostrou que há um aumento transitório da ativação neuronal no núcleo subfornical durante a fase aguda da sepse, que retorna ao estado basal após 24 horas (Fig. 14). Imunomarcação de NLRP3, por sua vez, teve uma maior intensidade nos animais sépticos, mas não é colocalizada com células microgliais, identificadas pela marcação de Iba-1 (Fig. 15). Por outro lado, é altamente coexpressa por células endoteliais (Fig. 16, pontas de seta) e também por células que estão no lúmen vascular, possivelmente aderidas aos vasos (Fig. 16, setas). IL-1 β é expresso em células da microglia do SFO de camundongos sépticos (Fig. 17, pontas de seta), mas outras células também parecem produzir essa citocina (Fig. 17, setas).

Figura 14: Fotomicrografias mostrando imunorreatividade para Fos (vermelho) e DAPI (azul) em cortes coronais através do SFO de animais sépticos 6 e 24 horas após o CLP (a). As imagens foram obtidas em microscópio confocal. Objetiva: 40x. Escala = 50 μ m. (b) Gráfico mostrando o número de células positivas para Fos/mm² no SFO. As barras representam a média $\pm$ DP. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. * = $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle. Número de animais por grupo: 4.

Figura 15: Fotomicrografias mostrando imunoreatividade para Iba-1 (verde) e NLRP3 (vermelho) em cortes coronais do SFO de animais sépticos. As imagens foram obtidas em microscópio confocal. Objetiva: 40x. Escala = 50µm

Figura 16: (a-c) Fotomicrografias mostrando imunorreatividade para laminina (verde) e NLRP3 (vermelho). (d-e) As pontas de seta indicam colocalização de laminina e NLRP3, enquanto as setas mostram células NLRP3-positivas que não são células endoteliais, se assemelhando a células aderentes. As imagens foram obtidas em microscópio confocal. Objetiva: 40x. Escala = 50µm.

Figura 17: Fotomicrografias mostrando imunorreatividade para Iba-1 (verde) e IL-1 β (vermelho). As pontas de seta indicam colocalização de Iba-1 e IL-1 β , enquanto as setas mostram células IL-1 β -positivas que não são células microgliais. As imagens foram obtidas em microscópio confocal. Objetiva: 40x. Escala = 50 μ m.

4.2.4 Conectividade do PVN

Utilizando um neurotraçador retrógrado (CTB) injetado no núcleo paraventricular e posterior imunomarcção para c-fos, podemos determinar quais neurônios que se projetam para o PVN estão ativados durante a fase aguda da sepse. Uma marcação mais intensa foi observada na porção dorsal do OVLT (B), no núcleo supraquiasmático (C), na porção medial do BNST (E) e na parte ventral do órgão subfornical (F). Marcação mais discreta de CTB foi encontrada em neurônios do núcleo do trato solitário (D) e no núcleo parabraquial medial (G).

Figura 18: (a) Local de injeção de CTB (em vermelho) no núcleo paraventricular. Marcação nuclear (DAPI) em azul. (b-g) Fotomicrografias mostrando imunoreatividade para c-fos (verde) e CTB (vermelho) em cortes coronais do OVLT (b), no núcleo supraquiasmático (c), núcleo do trato solitário (d), BNST (e), órgão subfornical (f) e núcleo parabraquial (g) de animais sépticos 6 horas após o CLP. Imagens obtidas em microscópio confocal, aumento 40X, escala= 50 μ m.

5. DISCUSSÃO

A investigação acerca das alterações neuroendócrinas durante a sepse mostrou que a resposta inflamatória sistêmica promove alterações distintas temporalmente em diferentes eixos hormonais e que a inibição da ativação microglial modifica diferentemente a resposta desses eixos.

A fim de comprovar a ativação microglial no hipotálamo durante a sepse e justificar a pertinência desse estudo, além de validar o efeito da minociclina em inibir essa ativação, realizamos uma análise imuno-histoquímica no SON e PVN e quantificamos a expressão proteica de Iba-1 no hipotálamo. A imunomarcagem para Iba-1, proteína presente em células microgliais, revelou diferenças morfológicas entre animais controles e sépticos. Enquanto a microglia de animais não manipulados apresenta processos mais longos e finos, compatíveis com o que é considerado um estado de “repouso”, nos animais sépticos essas células tem ramificações mais curtas e espessas. Esta morfologia é relacionada a um estado “ativado” da microglia, quando ocorre a liberação de diversos mediadores inflamatórios tais como IL-1 β , TNF- α , IL-6, NO e ROS (EGGEN et al., 2013; MORRISON; FILOSA, 2013). Concordando com trabalhos anteriores, a injeção intracerebroventricular de minociclina foi capaz de modificar a morfologia celular nos animais sépticos, prevenindo a ativação microglial. A quantificação da expressão hipotalâmica de Iba-1 por *western blot* confirma esses resultados.

A expressão de GFAP no hipotálamo, um possível indicador de ativação astrocitária não foi alterada em nosso modelo. De fato, já foi demonstrado que a resposta inflamatória dessas células é mais tardia do que a da microglia (NORDEN et al., 2016; BELLAVER et al., 2018). Porém, a produção de citocinas por astrócitos pode anteceder o aumento da expressão de GFAP (NORDEN et al., 2016) assim, não podemos descartar uma possível participação dessas células na neuroinflamação hipotalâmica.

Quanto às alterações endócrinas em nosso modelo, vamos abordar separadamente cada eixo estudado, começando pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, o principal glicocorticóide produzido em roedores, mostra uma resposta esperada do organismo como uma tentativa de restabelecer a homeostase corporal após um estímulo nocivo- a sepse. Conforme já observado em diversos estudos experimentais (CARLSON et al., 2007; FLIERL et al., 2011; YAMASHITA et al., 2017), bem como clínicos (BOONEN et al., 2013; VENKATESH et al., 2015; VARDAS et al., 2017), há um aumento progressivo dos níveis de corticosterona/ cortisol durante os estágios iniciais da sepse. Nosso estudo mostrou, porém, que o aumento desse hormônio não está associado ao aumento do seu principal estimulador hipofisário em situações fisiológicas, o hormônio adrenocorticotrófico, que se encontra em níveis abaixo do basal nos animais sépticos. Tal dissociação entre a secreção

desses hormônios, mostra uma possível ruptura no eixo HPA durante a sepse, o que de fato já foi relatado em trabalhos anteriores (BORNSTEIN et al., 2008; FLIERL et al., 2011; BOONEN et al., 2013).

Diversos mecanismos de origem central e periférica têm sido propostos para explicar esse desequilíbrio. Centralmente, o TNF- α pode diretamente levar ao aumento da síntese de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (BERNARDINI et al., 1990), porém a análise *in vitro* de cultura de células hipofisárias mostrou que o TNF- α inibe a secreção de ACTH dependente de CRH (GAILLARD et al., 1990). Esses resultados nos levam a inferir que essa citocina seja, ao menos em parte, responsável pelos níveis diminuídos de ACTH durante a sepse por causar comprometimento da síntese hipofisária deste hormônio. O estudo de POLITO et al., 2011, fortalece essa hipótese, uma vez que encontrou conteúdo basal (em pacientes) ou aumentados (em ratos) de RNA mensageiro para CRH em neurônios parvocelulares durante a sepse sendo que a expressão de ACTH na adenohipófise estava diminuída em ambos os modelos. Esse mesmo estudo mostrou uma correlação entre o aumento da expressão de iNOS e a diminuição de ACTH. Trabalhos anteriores do nosso laboratório mostraram que tanto a expressão (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2014) quanto a atividade (WAHAB et al., 2015) dessa enzima estão aumentadas no hipotálamo em nosso modelo de sepse.

Apesar da redução da síntese de ACTH, os níveis de corticosterona estão progressivamente elevados nos animais sépticos. Esse dado nos direciona para a participação de possíveis mecanismos periféricos de liberação de esteróides independentes de corticotrofina. O aumento das citocinas plasmáticas que ocorre tanto em 6 como em 24 horas após o estímulo séptico pode diretamente promover o aumento da secreção de corticosterona (BETHIN et al., 2000; MIKHAYLOVA et al., 2007). Além da presença de receptores para IL-1 e IL-6, o córtex adrenal expressa ainda receptores do tipo *toll* 2 e 4 (TLR2 e TLR4, respectivamente), sugerindo a participação da resposta imune inata na ativação da esteroidogênese (BORNSTEIN et al., 2004). O comprometimento hepático decorrente da sepse leva ainda à diminuição da CGB (*cortisol binding globulin*) e da albumina plasmática, que são responsáveis pela maior parte do cortisol no sangue, deixando mais hormônio circulante em sua forma livre (não-ligada) (HO et al., 2006). A expressão de enzimas envolvidas no *clearance* e metabolismo do cortisol, como a 5 α -redutase e 5 β -redutase (fígado) e 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (rins), também estão diminuídas durante a sepse, contribuindo ainda mais para o aumento nos níveis plasmáticos desse hormônio (BOONEN et al., 2013; BOONEN; VAN DEN BERGHE, 2014).

O tratamento com minociclina mudou o padrão de liberação de ACTH somente 24 horas após o CLP, mas decorridas 6 horas da cirurgia já ocorreu um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, que se potencializou ainda mais em 24 horas. Temos diferentes hipóteses relacionadas a cada *timepoint* para esses resultados.

Na fase mais inicial da doença, em 6 horas, o aumento da secreção de corticosterona após a inibição da ativação microglial pode ser explicado não por modificações diretas no eixo HPA (já que não há aumento da síntese de ACTH), mas por outros mecanismos centrais e periféricos. Nessa fase notamos que há um aumento significativo dos níveis circulantes de IL-6 nos ratos sépticos tratados com minociclina. Já foi mostrado que essa citocina pode atuar na produção de corticosterona diretamente na glândula adrenal, independente de modificações hipotalâmicas ou hipofisárias (BETHIN et al., 2000). Porém, não sabemos ao certo como a injeção de minociclina promoveu esse aumento de IL-6 plasmático; especulamos que mecanismos centrais regulados pela ativação de células da microglia estejam envolvidos nesse processo. De fato, outros autores já mostraram que a manipulação de vias centrais (através da injeção intracerebroventricular de nicotina, L-NAME ou 7-NI, por exemplo) promove um substancial aumento da IL-6 plasmática, mas não de TNF- α , através da adrenalina produzida na medula adrenal (SONG et al., 1999; SONG et al., 2000).

Em 24 horas, numa fase mais avançada da doença, a inibição da ativação microglial também promove uma estimulação do eixo HPA. Diferentemente do grupo de 6 horas, acreditamos que o aumento da corticosterona plasmática após a injeção de minociclina é diretamente ligado à ação de mecanismos centrais que aumentam a síntese de ACTH. A minociclina foi capaz de reverter a expressão de IL-1 β , TNF- α e IL-6 no hipotálamo, mostrando uma ação esperada da droga ao inibir a síntese de mediadores relacionados a um fenótipo M1 (pró-inflamatório) das células microgliais (KOBAYASHI et al., 2013; MICHELS et al., 2019). A droga foi capaz ainda de diminuir os níveis plasmáticos de IL-1 β , resultado semelhante ao que nosso grupo obteve ao injetar i.c.v. um antagonista do receptor de IL-1 no mesmo modelo de sepse que utilizamos (WAHAB et al., 2016). A expressão de receptores para glicocorticoide no hipotálamo, que também poderia influenciar a regulação do eixo HPA (LARYEA et al., 2013), apesar de aumentada em animais sépticos, não se alterou com a inibição da ativação microglial.

O aumento da produção de mediadores inflamatórios hipotalâmicos durante a sepse pode causar, dentre várias ações deletérias, o comprometimento da função mitocondrial e consequente estresse oxidativo (COMIM et al., 2011; BOZZA et al., 2013; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2014). O aumento do estresse nitrosativo/oxidativo adrenal e hipofisário

compromete a ativação do eixo HPA pela diminuição da síntese de ACTH, o que é revertido com protocolos antioxidantes (DUAN et al., 2016; MERCAU et al., 2016). O bloqueio da ativação microglial pode inibir esse comprometimento mitocondrial em 24 horas através da diminuição de citocinas circulantes e hipotalâmicas e assim promover o aumento da produção de ACTH que foi observado. Já mostramos anteriormente que o bloqueio da via central da IL-1 durante a sepse, por exemplo, diminui a expressão de proteínas ligadas ao estresse oxidativo no hipotálamo e melhora a função endócrina (WAHAB et al., 2016).

Passando para uma análise dos hormônios neurohipofisários, a secreção de ocitocina teve um aumento na fase aguda da sepse, enquanto que na fase tardia (24 horas), houve um retorno aos níveis basais. Como já foi citado anteriormente, esse perfil temporal de secreção durante a sepse experimental é idêntico ao do outro hormônio neurohipofisário, a vasopressina, que foi amplamente estudado pelo nosso grupo (CORRÊA et al., 2007; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009; WAHAB et al., 2016; OLIVEIRA-PELEGRIN, et al., 2013a; DA COSTA et al., 2017). Na fase inicial da doença, acreditamos que o aumento das citocinas inflamatórias na corrente sanguínea seja um dos estímulos relevantes para a secreção desses hormônios (YASIN et al., 1994; BRUNTON et al., 2012). Além disso, as células microgliais ativadas do PVN possuem receptores P2X7, que são capazes de liberar localmente IL-1 β , TNF- α e IL-6 e promover a secreção hormonal (DU et al., 2015; SAVIO et al., 2017).

Acreditamos que os mediadores inflamatórios possuem um papel chave na resposta bifásica dessa secreção durante a inflamação sistêmica. Inicialmente, a ação dessas citocinas seria benéfica ao organismo, visto que a ativação do sistema ocitocinérgico permitiria que este hormônio exercesse sua atividade imunomodulatória. Já foi demonstrado que durante a sepse a ocitocina reduz a síntese de NO, IL-1 β e TNF- α em monócitos (OLIVEIRA-PELEGRIN, SAIA, et al., 2013b), além de melhorar a função respiratória (ELORZA-AVILA et al., 2017) e cardíaca (REYES-LAGOS et al., 2016) e ter ação antioxidante (ISERI et al., 2005a; b). A vasopressina também possui ação anti-inflamatória, diminuindo a síntese de IL-1 β e TNF- α em astrócitos (ZHAO, 2004) e durante a sepse diminui a inflamação pulmonar e os níveis de IL-6 plasmáticos através da atenuação da ativação de NF κ B (BOYD et al., 2008). Assim, o estímulo da secreção de OT e AVP seria uma tentativa do organismo de resolver o quadro inflamatório sistêmico.

Porém, quando não há a resolução da resposta inflamatória, ela passa a comprometer o funcionamento do organismo. Nosso grupo já mostrou que a sepse induz alterações deletérias no SON e PVN, núcleos que abrigam os neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos, comprometendo a função endócrina. O excesso na produção de óxido nítrico e mediadores

inflamatórios (CORRÊA et al., 2007; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2010), o estresse oxidativo (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2014; WAHAB et al., 2015) e a morte celular (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2013a; DA COSTA et al., 2017) são alguns dos fatores que poderiam contribuir para o comprometimento da secreção desses hormônios na sepse.

A administração central de minociclina teve efeitos temporais opostos sobre a secreção de OT e AVP na sepse. Na fase inicial, o bloqueio da ativação microglial diminuiu os níveis plasmáticos de OT, enquanto aumentou AVP. Na fase tardia, porém, ocorreu um aumento da secreção de ocitocina, sem alteração nos níveis de vasopressina.

Acreditamos que mecanismos centrais e periféricos possam estar envolvidos nas alterações 6 horas após o CLP. Como foi mostrado, a administração de minociclina promoveu alterações no conteúdo hipotalâmico de sinaptofisina, sugerindo uma regulação microglial da atividade cerebral na sepse. A sinaptofisina é uma proteína integral de membrana presente em vesículas sinápticas, organela de estoque de neurotransmissores, e é utilizada como marcador de densidade sináptica e, consequentemente, de dano neuronal (VALTORTA et al., 2004). Ao contrário de outros estudos (SCHWALM et al., 2014; NEVES et al., 2016; HAN et al., 2017) nossos resultados mostraram que a sepse promoveu um aumento pontual da expressão dessa proteína. Acreditamos que essa divergência aconteceu porque esses estudos anteriores analisaram estágios mais tardios (dias) da sepse, ou então analisaram áreas cerebrais diferentes (geralmente relacionadas à cognição e memória). Talvez exista uma cinética diferente no hipotálamo, com um inicial aumento da atividade sináptica que, com a progressão da doença, vai diminuindo. Tendo em vista que o hipotálamo é uma região cerebral de controle de diversas funções vegetativas (cardiovasculares, endócrinas, etc.), na fase inicial da sepse pode ocorrer um aumento da atividade sináptica na tentativa de preservar as funções orgânicas, mas que vai se esgotando conforme a inflamação persiste. Moraes e colaboradores (2014) mostraram que células da micróglia estimuladas com LPS diminuem o número de sinapses excitatórias corticais, enquanto que células astrocitárias estimuladas são sinaptogênicas. Os resultados aqui apresentados mostram que em 6 horas há um aumento ainda maior na expressão de sinaptofisina quando bloqueamos a ativação microglial. Podemos supor que a sepse promove inicialmente uma estimulação astrocitária no hipotálamo, aumentando a atividade sináptica local, mas que vai sendo negativamente contrabalanceada pela ativação microglial, que é deletéria.

Assim, supomos que diferentes vias neuronais excitatórias ou inibitórias que regulam direta ou indiretamente a secreção de AVP e OT estejam diferentemente ativadas após a inibição da ativação microglial, o que explicaria os efeitos opostos da ação da minociclina durante a fase aguda.

Já na fase tardia da sepse, acreditamos que o aumento da secreção de ocitocina após a inibição da ativação microglial poderia ser explicado pela diminuição dos efeitos deletérios da neuroinflamação hipotalâmica. Mostramos que após 24 horas há um aumento da expressão hipotalâmica da subunidade p65 do NFκB, o que é prevenido com a administração de minociclina. O NFκB é um fator de transcrição envolvido na síntese de diversos mediadores inflamatórios (LAWRENCE, 2009). Fisiologicamente, ele encontra-se situado no citoplasma ligado à uma proteína inibitória (IκB), que diante de um estímulo infeccioso ou inflamatório é fosforilada e permite então que as duas subunidades (p50 e p65) do NFκB se transloquem para o núcleo e regulem a transcrição de genes específicos envolvidos na produção de mediadores inflamatórios (TAK; FIRESTEIN, 2001; SHIH et al., 2015). Esse resultado está de acordo com o aumento de citocinas pró-inflamatórias que observamos no hipotálamo, 24 horas após a sepse.

A ação desses mediadores inflamatórios durante a sepse pode induzir apoptose de diferentes células cerebrais, comprometendo a secreção hormonal (POLITO et al., 2011; DA COSTA et al., 2017). Após 24 horas do estímulo séptico, constatamos uma diminuição da expressão de BCL-2 no hipotálamo. O BCL-2 é uma proteína antiapoptótica que atua a fim de manter a homeostase mitocondrial, impedindo a oligomerização de proteínas pró-apoptóticas como BAX/BAK, o que evita a perda do potencial de membrana mitocondrial e a liberação de citocromo-c para o citoplasma (KIM, 2005; LEBER et al., 2010). A morte celular no hipotálamo pode ser um dos fatores envolvidos na diminuição da síntese de AVP e OT. Nosso grupo já mostrou que a sepse promove o aumento da expressão de caspase-3 clivada, um marcador final na cascata de apoptose, nos núcleos paraventricular e supraóptico (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2014). Obtivemos resultados que reforçam esses dados, uma vez que a sepse aumentou a expressão de caspase-3 clivada e também de PARP clivada no hipotálamo. A *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) é uma enzima nuclear com peso molecular de 116kDa que na cascata de apoptose é clivada em dois fragmentos (89kDa e 24kDa) por caspases efetoras, como a caspase-3 e -7 (CHAITANYA et al., 2010). O fragmento de 89kDa possui o domínio catalítico e efetor dessa enzima e atua nas etapas finais do processo de morte programada, principalmente através da clivagem de DNA (SOLDANI; SCOVASSI, 2002).

O pré-tratamento com minociclina inibe a diminuição dos níveis hipotalâmicos de BCL-2, bem como o aumento da expressão de caspase-3 e PARP clivadas. Podemos inferir que essas ações previnam a morte neuronal e de outras células na sepse, garantindo um equilíbrio maior na função hipotalâmica e promovendo o aumento da secreção hormonal. Lembramos, porém, que os níveis de AVP na fase tarde permaneceram baixos mesmo após a administração de minociclina. Supomos que o aumento ainda maior da secreção desse hormônio na fase inicial

possa ter exaurido a capacidade hipotalâmica de sua síntese, transporte e/ou secreção, mesmo com a melhora do quadro neuroinflamatório.

São escassos na literatura os trabalhos que investiguem os níveis circulantes de prolactina (PRL) após estímulo inflamatório sistêmico, sendo que a grande maioria desses artigos induziu endotoxemia através da administração de lipopolissacarídeo (LPS). Mesmo sendo um modelo diferente do que utilizamos, o choque endotoxêmico também produz alterações inflamatórias sistêmicas e centrais que podem nos dar pistas para compreender os resultados que encontramos.

Além de poucos, os artigos utilizando modelos animais são contraditórios quanto ao perfil de secreção desse hormônio após o estímulo inflamatório, alguns indicando seu aumento (RODRIGUEZ et al., 2005; HERMAN et al., 2010) ou diminuição (HOLLIS et al., 2005). Diferenças na metodologia empregada (administração de LPS, de citocinas ou ligadura e punção cecal), na dose de endotoxina, nos *períodos* analisados e nas espécies/ linhagens utilizadas poderiam explicar essas divergências.

O estudo de De Laurentiis et al. (2002) encontrou perfil semelhante ao nosso na secreção de PRL. Com injeção intraperitoneal de LPS, em duas diferentes doses (100µg/rato e 250µg/rato) e diferentes períodos (1 e 3 horas), houve uma diminuição dos níveis circulantes desse hormônio. Além disso, houve um aumento dos níveis hipotalâmicos e adenohipofisários de dopamina (DA), ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e da razão DOPAC/DA. A dopamina é o principal regulador da secreção pituitária de prolactina, tendo um efeito inibitório sobre sua secreção. Os neurônios dopaminérgicos que controlam esse eixo têm seus corpos celulares localizados no hipotálamo, especificamente no núcleo arqueado (FREEMAN et al., 2000). Três subpopulações neuronais integram esse sistema: os neurônios tuberoinfundibulares (TIDA), que se projetam para a eminência mediana e liberam DA no sistema portal e os neurônios tuberohipofisários (THDA) e periventricular hipofisários (PHDA), que direcionam seus axônios para as regiões posterior e intermédia da hipófise, que posteriormente chegam à adenohipófise através de pequenos vasos portais (FREEMAN et al., 2000; GRATAN, 2015). Durante a sepse há um aumento dos níveis de dopamina tanto no hipotálamo, como na hipófise anterior, sugerindo que neurônios TIDA estejam envolvidos na diminuição da secreção de PRL (DE LAURENTIIS et al., 2002). Na neuro-hipófise, apesar de não haver alteração no conteúdo de DA e DOPAC nos animais sépticos, a razão DOPAC/DA (considerado um bom índice da atividade neuronal dopaminérgica) está aumentada, assim podemos inferir que a ativação de neurônios PHDA e THDA também regula a hipoprolactenemia na sepse. O papel fundamental da dopamina nessa hiposecreção foi comprovado pela injeção de um inibidor de receptores

dopaminérgicos D1 e D2 (*sulpiride sulfate*) que preveniu a diminuição da liberação de prolactina após administração de LPS (DE LAURENTIIS et al., 2002).

A inibição da ativação microglial não teve efeito sobre o padrão de secreção de PRL nos animais sépticos. Nossa hipótese é de que particularidades funcionais no núcleo arqueado (ARC) possam explicar este achado. A análise da ativação microglial nesse núcleo através da administração de LPS *ex vivo* mostrou que subpopulações celulares tem resposta antagônicas quanto à atividade neuronal, que podem ou não ser modificadas com a administração de minociclina (REIS et al., 2015). Dentre os tipos neuronais encontrados no ARC destacam-se os neurônios que sintetizam POMC (pró-opiomelanocortina) e neuropeptídeo Y (NPY), hormônios que regulam a secreção de dopamina e de prolactina (TONG; PELLETIER, 1992; WANG et al., 1996; SERGEYEV et al., 2001). Assim, podemos supor que a inibição da ativação microglial afeta de maneira oposta esses peptídeos, de modo que não se altere a secreção de PRL nesses animais.

Os diversos efeitos causados pela inibição da ativação microglial, porém, não promoveram efeito na sobrevivência dos animais sépticos, mesmo após 48 horas do CLP. Uma possível explicação para esse resultado estaria no próprio modelo experimental. Nosso modelo de CLP é agressivo e tem alta mortalidade, em torno de 60% em 24 horas, assim talvez seria necessária uma intervenção mais robusta (aumento na dose de minociclina, por exemplo) para que a resposta fosse mais efetiva a ponto de alterar a mortalidade. Outra possível hipótese seria o aumento contínuo na secreção de corticosterona após o uso de minociclina. Na prática clínica, o uso de corticóides como tratamento é utilizado com cautela, sendo que na sepse os *guidelines*, apesar de incluírem seu uso, o fazem com restrições (DELLINGER et al., 2013). Seu uso clínico no tratamento da sepse de maneira dose- tempo-dependentes da terapia traz resultados conflitantes sobre a mortalidade dos pacientes (ANNANE, 2016), sendo que diversos estudos mostram que não há diferença de mortalidade associada ao uso de corticoides (KALIL, SUN, 2011; VOLBEDA et al., 2015; GIBBISON et al., 2017).

Já a investigação da modulação da ativação do núcleo paraventricular (PVN) em camundongos sépticos mostrou modificações que seriam relevantes em um contexto de inflamação sistêmica.

O PVN é um núcleo citoarquiteticamente complexo que possui neurônios com distintas morfologias e funções no sistema endócrino. Estão incluídos neurônios parvocelulares, células de tamanho médio e pequeno que se projetam para outras regiões do SNC e para a eminência mediana, e neurônios magnocelulares, que sintetizam e secretam vasopressina e

ocitocina e se projetam para a neuro-hipófise (BIAG et al., 2012). A função do PVN é igualmente complexa: é um importante centro regulatório cerebral, tendo um importante papel orquestrando mudanças autonômicas/ cardiovasculares, comportamentais e hormonais durante situações fisiológicas e patológicas (BENARROCH, 2005). Com isso, podemos inferir que esse núcleo é particularmente relevante na fisiopatologia da sepse, uma vez que essa doença promove diversas consequências fisiopatológicas deletérias no funcionamento cerebral (MAZERAUD et al., 2016).

Já foi citado anteriormente que a sepse promove um padrão bifásico de secreção de AVP e OT, com níveis plasmáticos aumentados na fase inicial que diminuem com a progressão da doença. Embora não tenhamos analisado os níveis plasmáticos desses hormônios nos camundongos desse estudo, nós realizamos uma imunofluorescência com dupla marcação para AVP/OT e Fos, um marcador de ativação neuronal. Pela primeira vez foi analisado imunomarcação para Fos de diferentes populações celulares no PVN de camundongos durante a sepse e os resultados foram congruentes com os dados existentes em ratos, com aumento na ativação de neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos na fase inicial da sepse (6 horas) e diminuição em um estágio tardio (24 horas) (CORRÊA, et al., 2007; OLIVEIRA-PELEGRIN et al. 2009). Esses dados indicam que o comprometimento na secreção hormonal da fase tardia pode ser ao menos em parte relacionado à uma diminuição na ativação de neurônios que sintetizam esses hormônios no PVN.

Também já descrevemos anteriormente algumas possíveis causas para a disfunção e diminuição da função neuronal e hormonal na sepse, incluindo a ativação microglial (DA COSTA et al., 2017). Diferentemente do que vimos em ratos do primeiro objetivo deste trabalho, realizamos aqui uma análise quantitativa e semiautomática da morfologia microglial, sendo mais precisa e mais tecnicamente rigorosa. A análise da morfologia dessas células no PVN de camundongos demonstrou que apresentam uma redução no número de ramificações e de terminações durante a sepse, consistente com um fenótipo ativado (MORRISON; FILOSA, 2013; HEINDL et al., 2018). A ativação dessas células leva à produção de citocinas e outros mediadores que contribuem para a neuroinflamação e seus consequentes efeitos deletérios (EGGEN et al., 2013; MICHELS et al., 2015b).

Apesar da relevância dos processos dentro do núcleo paraventricular, nós não podemos excluir a importância da regulação deste núcleo por outras áreas cerebrais. A fim de investigar esse aspecto, nós injetamos um neurotraçador retrógrado (CTB) no PVN e durante a fase aguda da sepse, quando o cérebro está altamente ativado, nós investigamos quais outras regiões que se comunicam com PVN também estariam ativadas.

Baseados numa investigação prévia do laboratório, onde foi realizada uma cartografia da ativação neuronal 6 horas após o CLP (dados não publicados), alguns núcleos foram escolhidos para análise baseado na possível relevância no controle endócrino.

O núcleo parabraquial (PBN) e o núcleo do trato solitário (NTS) são duas estruturas que apresentam intensa ativação neuronal durante a sepse. Estas áreas estão intimamente relacionadas à regulação da pressão arterial e volume sanguíneo (DAVERN, 2014). A hipotensão severa causada pela inflamação sistêmica leva à ativação dessas regiões, numa tentativa de obter novamente o controle da pressão arterial (BRUHN et al., 2009). A marcação pelo CTB de neurônios positivos para Fos foi discreta no PBN e no NTS. Nós acreditamos que a maior distância em relação ao sítio de injeção exigiria mais tempo para que o traçador chegasse a esses núcleos e produzisse uma marcação mais consistente. Estudos prévios já demonstraram a conexão do PVN com essas regiões (SILVERMAN et al., 1981; TOKITA et al., 2009).

Outra área com importante comunicação com o PVN é o núcleo supraquiasmático (SCH). Consistente com estudos de traçamento anteriores (SAWCHENKO; SWANSON, 1983; LEAK; MOORE, 2001), nós observamos que a porção dorsomedial do SCH é a maior fonte de projeções para o PVN. Estes neurônios projetam-se em sua maioria para células parvocelulares que sintetizam CRH e podem influenciar no ritmo circadiano da ativação do eixo HPA (VRANG et al., 1995; REGHUNANDANAN; REGHUNANDANAN, 2006). Perturbações no ritmo circadiano durante a sepse já foram demonstrados em estudos clínicos e experimentais (O'CALLAGHAN et al., 2012; COIFFARD et al., 2019). A sepse também ativa neurônios da região anteroventral do BNST (*bed nucleus of the stria terminalis*) que se projetam para o PVN. Esta sub-região é de fato a maior fonte de projeções hipotalâmicas, principalmente de neurônios com atividade glutamatérgica e GABAérgica (GUNGOR; PARE, 2016). Há evidências que durante a inflamação sistêmica o BNST tenha importante função na modulação do *sickness behavior* e na regulação do eixo HPA (CRANE et al., 2003; BIENKOWSKI; RINAMAN, 2008; WANG et al., 2019).

Os órgãos circunventriculares (CVOs) também são origem importante de projeções para o núcleo paraventricular. Essas áreas cerebrais especializadas são as estruturas mais vascularizadas do cérebro e tem capilares fenestrados que permitem uma íntima comunicação entre componentes circulantes e o SNC (MIYATA, 2015). Durante a sepse nós observamos uma ativação mais proeminente em dois CVOs: o *organum vasculosum lamina terminalis* (OVLT) e o órgão subfornical (SFO). Já foi demonstrado que esses dois núcleos são os que possuem ativação mais rápida e mais potente após um estímulo imune, como LPS ou injeção

de IL-6 (HARRE et al., 2003; OTT et al., 2010). Estes órgãos tem íntima relação funcional e anatômica, uma vez que tem a mesma origem embrionária (DUVERNOY; RISOLD, 2007), além de ter papéis similares na regulação neuroendócrina, principalmente quanto à osmorregulação e secreção de vasopressina, apetite ao sal e controle da sede (SAMSON, FERGUSON, 2015). Pacientes sépticos tem alterações na percepção da sede (SIAMI et al., 2013) e experimentalmente foi demonstrado um desbalanço entre a atividade neuronal do OVLT e SON (STARE et al., 2015). Lesões no SFO causaram uma diminuição na ativação neuronal do PVN e uma redução na secreção de vasopressina após injeção de LPS em ratos (BORGES; DA ROCHA, 2006).

Esses CVOs possuem também grande interação com o sistema imune. Astrócitos no SFO e no OVLT expressam TLR4, um receptor para lipopolissacarídeo que inicia a resposta neuroinflamatória (NAKANO et al., 2015). O LPS induz a translocação de proteínas nucleares (STAT3, NF κ B, etc) que promovem a transcrição de diversos genes envolvidos na síntese de mediadores inflamatórios. Células microgliais também contribuem com esse processo, uma vez que o uso de minociclina diminui a resposta neuroinflamatória no SFO e OVLT (NAKANO et al., 2015).

Dada a importância do SFO no controle endócrino e a identificação de vários neurônios ativados nesse núcleo que se projetam para o PVN durante a sepse, decidimos realizar uma investigação mais detalhada dos eventos neuroinflamatórios locais durante a inflamação sistêmica.

A imunomarcagem para Fos no SFO mostrou que sua ativação segue o mesmo padrão observado em neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do PVN durante a sepse: na fase inicial os neurônios estão altamente ativados, mas não na fase tardia. Análise imuno-histoquímica também mostrou um aumento da expressão de NLRP3 nos animais sépticos, principalmente no endotélio e em células aderentes. NLRP3 é uma proteína que forma o inflamassoma NLRP3, um complexo que desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18 (YANG et al., 2019). Sua síntese pode ser induzida e aumentada pelo reconhecimento de PAMPs e DAMPs ou por citocinas como TNF- α e IL- β (SWANSON et al., 2019). A síntese de IL- β , por sua vez, parece não ocorrer somente por células endoteliais do SFO, mas também por células microgliais. A microglia é uma importante fonte de mediadores inflamatórios na sepse e a IL- β tem um papel chave na neuroinflamação, mediando alterações endócrinas e comportamentais na inflamação sistêmica (MORAES et al., 2014; WAHAB et al., 2016). A neuroinflamação local no SFO pode direta ou indiretamente induzir alterações no sistema neuroendócrino durante a sepse, uma vez que ele possui conexões

não somente com o PVN, mas também com o SON, controlando principalmente a síntese de AVP (MANGIAPANE et al., 1984; SMITH; FERGUSON, 2010).

Em conjunto, os resultados apresentados nesse estudo reforçam que a sepse induz alterações no sistema endócrino, demonstrado pelas mudanças no padrão de ativação de neurônios que sintetizam AVP e OT no núcleo paraventricular. Devido seu papel integrador, o PVN recebe projeções de diversas regiões cerebrais, principalmente daquelas relacionadas ao controle endócrino e autonômico e que estão ativadas durante um estímulo imune. Alterações não somente no PVN em si, mas também em outras regiões cerebrais que se projetam para esse núcleo podem afetar sua função durante a sepse.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que a ativação de células microgliais modula a resposta neuroendócrina durante a sepse, regulando de maneira distinta a secreção de cada hormônio em diferentes momentos da doença. Alterações inflamatórias e sinápticas causadas pela ativação microglial estão associadas às modificações endócrinas na sepse.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, M. R. et al. Neuroinflammation in the NTS is associated with changes in cardiovascular reflexes during systemic inflammation. **J Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 125, Jun 20 2019.
- ANNANE, D. The Role of ACTH and Corticosteroids for Sepsis and Septic Shock: An Update. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 7, p. 70, 2016.
- ARAQUE, A. et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends Neurosci**, v. 22, n. 5, p. 208-15, May 1999.
- BELLAVER, B. et al. Systemic Inflammation as a Driver of Brain Injury: The Astrocyte as an Emerging Player. **Mol Neurobiol**, v. 55, n. 3, p. 2685-2695, Mar 2018.
- BENARROCH, E. E. Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. **Clin Auton Res**, v. 15, n. 4, p. 254-63, Aug 2005.
- BERG, R. M.; MOLLER, K.; BAILEY, D. M. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 31, n. 7, p. 1532-44, Jul 2011.
- BERNARDINI, R. et al. Interactions between tumor necrosis factor- α , hypothalamic corticotropin-releasing hormone, and adrenocorticotropin secretion in the rat. **Endocrinology**, v. 126, n. 6, p. 2876-81, Jun 1990.
- BETHIN, K. E.; VOGT, S. K.; MUGLIA, L. J. Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 16, p. 9317-22, Aug 2000.
- BIAG, J. et al. Cyto- and chemoarchitecture of the hypothalamic paraventricular nucleus in the C57BL/6J male mouse: a study of immunostaining and multiple fluorescent tract tracing. **J Comp Neurol**, v. 520, n. 1, p. 6-33, Jan 1 2012.
- BIENKOWSKI, M. S.; RINAMAN, L. Noradrenergic inputs to the paraventricular hypothalamus contribute to hypothalamic-pituitary-adrenal axis and central Fos activation in rats after acute systemic endotoxin exposure. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 1093-102, Oct 28 2008.
- BONE, R. C.; SIBBALD, W. J.; SPRUNG, C. L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1481-3, Jun 1992.
- BOONEN, E.; VAN DEN BERGHE, G. Cortisol metabolism in critical illness: implications for clinical care. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 21, n. 3, p. 185-92, Jun 2014.
- BOONEN, E. et al. Reduced cortisol metabolism during critical illness. **N Engl J Med**, v. 368, n. 16, p. 1477-88, Apr 2013.

BORGES, B. C.; DA ROCHA, M. J. Participation of the subfornical nucleus in hypothalamic-neurohypophyseal axis activation during the early phase of endotoxic shock. **Neurosci Lett**, v. 404, n. 1-2, p. 227-31, Aug 14 2006.

BORNSTEIN, S. R. et al. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. **Trends Endocrinol Metab**, v. 19, n. 5, p. 175-80, Jul 2008.

BORNSTEIN, S. R. et al. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human adrenals. **Horm Metab Res**, v. 36, n. 7, p. 470-3, Jul 2004.

BOZZA, F. A. et al. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. **Shock**, v. 39 Suppl 1, p. 10-6, May 2013.

BRUHN, F. H. et al. Blocking systemic nitric oxide production alters neuronal activation in brain structures involved in cardiovascular regulation during polymicrobial sepsis. **Neurosci Lett**, v. 453, n. 3, p. 141-6, Apr 10 2009.

BRUNTON, P. J.; BALES, J.; RUSSELL, J. A. Allopregnanolone and induction of endogenous opioid inhibition of oxytocin responses to immune stress in pregnant rats. **J Neuroendocrinol**, v. 24, n. 4, p. 690-700, Apr 2012.

CABEZAS, R. et al. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 211, 2014.

CALSAVARA, A. J. C. et al. Post-sepsis cognitive impairment and associated risk factors: A systematic review. **Aust Crit Care**, v. 31, n. 4, p. 242-253, Jul 2018.

CARLSON, D. E. et al. Central neural distribution of immunoreactive Fos and CRH in relation to plasma ACTH and corticosterone during sepsis in the rat. **Exp Neurol**, v. 205, n. 2, p. 485-500, Jun 2007.

CARLSON, D. E.; CHIU, W. C.; SCALEA, T. M. Cecal ligation and puncture in rats interrupts the circadian rhythms of corticosterone and adrenocortical responsiveness to adrenocorticotrophic hormone. **Crit Care Med**, v. 34, n. 4, p. 1178-84, Apr 2006.

CHAITANYA, G. V.; STEVEN, A. J.; BABU, P. P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. **Cell Commun Signal**, v. 8, p. 31, Dec 22 2010.

CHAPOULY, C. et al. Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions. **Brain**, v. 138, n. Pt 6, p. 1548-67, Jun 2015.

COIFFARD, B. et al. Circadian Rhythm Disruption and Sepsis in Severe Trauma Patients. **Shock**, v. 52, n. 1, p. 29-36, Jul 2019.

COMIM, C. M. et al. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. **Neurochem Res**, v. 36, n. 2, p. 304-11, Feb 2011.

CORRÊA, P. B. et al. Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis. **J Neuroimmunol**, v. 183, n. 1-2, p. 17-25, Feb 2007.

COSTANZA, M. et al. Prolactin: a versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology. **Autoimmun Rev**, v. 14, n. 3, p. 223-30, Mar 2015.

CRANE, J. W.; BULLER, K. M.; DAY, T. A. Evidence that the bed nucleus of the stria terminalis contributes to the modulation of hypophysiotropic corticotropin-releasing factor cell responses to systemic interleukin-1beta. **J Comp Neurol**, v. 46, n. 2, p. 232-42, Dec 8 2003.

CUNNINGHAM, C. L.; MARTÍNEZ-CERDEÑO, V.; NOCTOR, S. C. Diversity of neural precursor cell types in the prenatal macaque cerebral cortex exists largely within the astroglial cell lineage. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63848, 2013.

CUNNINGHAM, E. T.; SAWCHENKO, P. E. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. **Trends Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 406-11, Sep 1991.

DA COSTA, L. H. A. et al. Vasopressin Impairment During Sepsis Is Associated with Hypothalamic Intrinsic Apoptotic Pathway and Microglial Activation. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 7, p. 5526-5533, Sep 2017.

DAL-PIZZOL, F. et al. Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis. **Neurochem Res**, v. 35, n. 1, p. 1-12, Jan 2010.

DAVERN, P. J. A role for the lateral parabrachial nucleus in cardiovascular function and fluid homeostasis. **Front Physiol**, v. 5, p. 436, 2014.

DE LAURENTIIS, A. et al. Lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-alpha-induced changes in prolactin secretion and dopaminergic activity in the hypothalamic-pituitary axis. **Neuroimmunomodulation**, v. 10, n. 1, p. 30-9, 2002.

DE MAIO, A.; TORRES, M. B.; REEVES, R. H. Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. **Shock**, v. 23, n. 1, p. 11-7, Jan 2005.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Crit Care Med**, v. 41, n. 2, p. 580-637, Feb 2013.

DENNHARDT, R. et al. Patterns of endocrine secretion during sepsis. **Prog Clin Biol Res**, v. 308, p. 751-6, 1989.

DONG, X. X.; WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacol Sin**, v. 30, n. 4, p. 379-87, Apr 2009.

DU, D. et al. Microglial P2X(7) receptor in the hypothalamic paraventricular nuclei contributes to sympathoexcitatory responses in acute myocardial infarction rat. **Neurosci Lett**, v. 587, p. 22-8, Feb 5 2015.

DUAN, G. L. et al. Resveratrol alleviates endotoxemia-associated adrenal insufficiency by suppressing oxidative/nitrative stress. **Endocr J**, v. 63, n. 6, p. 569-80, Jun 2016.

DUNN, F. L. et al. The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. **J Clin Invest**, v. 52, n. 12, p. 3212-9, Dec 1973.

DUVERNOY, H. M.; RISOLD, P. Y. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. **Brain Res Rev**, v. 56, n. 1, p. 119-47, Nov 2007.

EGGEN, B. J. et al. Microglial phenotype and adaptation. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 8, n. 4, p. 807-23, Sep 2013.

ELORZA-AVILA, A. R. et al. Oxytocin's role on the cardiorespiratory activity of endotoxemic rats. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 236, p. 19-22, Feb 2017.

FLEISCHMANN-STRUZEK, C. et al. Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany. **Intensive Care Med**, v. 44, n. 11, p. 1826-1835, Nov 2018.

FLIERL, M. A. et al. Disturbances of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and plasma electrolytes during experimental sepsis. **Ann Intensive Care**, v. 1, p. 53, 2011.

FREEMAN, M. E. et al. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiol Rev**, v. 80, n. 4, p. 1523-631, Oct 2000.

FREUND, H. R. et al. Brain neurotransmitter profile is deranged during sepsis and septic encephalopathy in the rat. **J Surg Res**, v. 38, n. 3, p. 267-71, Mar 1985.

FRINCHI, M. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) activation in the rat hippocampus. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 14233, Oct 2 2019.

FUJIWARA, Y. et al. The roles of V1a vasopressin receptors in blood pressure homeostasis: a review of studies on V1a receptor knockout mice. **Clin Exp Nephrol**, v. 16, n. 1, p. 30-4, Feb 2012.

GAILLARD, R. C. et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. **Endocrinology**, v. 127, n. 1, p. 101-6, Jul 1990.

GIBBISON, B. et al. Corticosteroids in septic shock: a systematic review and network meta-analysis. **Crit Care**, v. 21, n. 1, p. 78, Mar 2017.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. **Physiol Rev**, v. 81, n. 2, p. 629-83, Apr 2001.

GIUSTI-PAIVA, A.; ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Inhibitory effect of gaseous neuromodulators in vasopressin and oxytocin release induced by endotoxin in rats. **Neurosci Lett**, v. 381, n. 3, p. 320-4, Jun 2005.

GOFTON, T. E.; YOUNG, G. B. Sepsis-associated encephalopathy. **Nat Rev Neurol**, v. 8, n. 10, p. 557-66, Oct 2012.

GONCHAROVA, N. D. Stress responsiveness of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis: age-related features of the vasopressinergic regulation. **Front. Endocrinol.** v. 4, n. 26, p. 1-15, Mar, 2013.

GRATTAN, D. R. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. **J Endocrinol**, v. 226, n. 2, p. T101-22, Aug 2015.

GUNGOR, N. Z.; PARE, D. Functional Heterogeneity in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. **J Neurosci**, v. 36, n. 31, p. 8038-49, Aug 3 2016.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). **Int J Oncol**, v. 22, n. 1, p. 15-20, Jan 2003.

GUTNICK, A.; LEVKOWITZ, G. The neurohypophysis: fishing for new insights. **J Neuroendocrinol**, v. 24, n. 6, p. 973-4, Jun 2012.

HAN, Q. et al. Microglia-derived IL-1 β contributes to axon development disorders and synaptic deficit through p38-MAPK signal pathway in septic neonatal rats. **J Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 52, Mar 2017.

HARRE, E. M. et al. Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. **Brain Res**, v. 980, n. 1, p. 151-5, Aug 1 2003.

HEINDL, S. et al. Automated Morphological Analysis of Microglia After Stroke. **Front Cell Neurosci**, v. 12, p. 106, 2018.

HERMAN, A. P.; ROMANOWICZ, K.; TOMASZEWSKA-ZAREMBA, D. Effect of LPS on reproductive system at the level of the pituitary of anestrus ewes. **Reprod Domest Anim**, v. 45, n. 6, p. e351-9, Dec 2010.

HO, J. T. et al. Septic shock and sepsis: a comparison of total and free plasma cortisol levels. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 1, p. 105-14, Jan 2006.

HOEFFEL, G.; GINHOUX, F. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. **Cell Immunol**, v. 330, p. 5-15, Aug 2018.

HOLLIS, J. H.; LIGHTMAN, S. L.; LOWRY, C. A. Lipopolysaccharide has selective actions on sub-populations of catecholaminergic neurons involved in activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and inhibition of prolactin secretion. **J Endocrinol**, v. 184, n. 2, p. 393-406, Feb 2005.

HOLMES, C. L. et al. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. **Chest**, v. 120, n. 3, p. 989-1002, Sep 2001.

HOLMES, C. L.; RUSSELL, J. A.; WALLEY, K. R. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. **Chest**, v. 124, n. 3, p. 1103-15, Sep 2003.

HOOGLAND, I. C. M. et al. Microglial Activation After Systemic Stimulation With Lipopolysaccharide and Escherichia coli. **Front Cell Neurosci**, v. 12, p. 110, 2018.

HOTCHKISS, R. S.; TINSLEY, K. W.; KARL, I. E. Role of apoptotic cell death in sepsis. **Scand J Infect Dis**, v. 35, n. 9, p. 585-92, 2003.

ISERI, S. O. et al. Oxytocin ameliorates oxidative colonic inflammation by a neutrophil-dependent mechanism. **Peptides**, v. 26, n. 3, p. 483-91, Mar 2005a.

_____. Oxytocin protects against sepsis-induced multiple organ damage: role of neutrophils. **J Surg Res**, v. 126, n. 1, p. 73-81, Jun 1 2005b.

JACOBI, J. Pathophysiology of sepsis. **Am J Health Syst Pharm**, v. 59 Suppl 1, p. S3-8, Feb 2002.

Jl, K. et al. Microglia actively regulate the number of functional synapses. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56293, 2013.

KADEKARO, M. et al. Cerebral metabolic responses and vasopressin and oxytocin secretions during progressive water deprivation in rats. **Am J Physiol**, v. 262, n. 2 Pt 2, p. R310-7, Feb 1992.

KALIL, A. C.; SUN, J. Low-dose steroids for septic shock and severe sepsis: the use of Bayesian statistics to resolve clinical trial controversies. **Intensive Care Med**, v. 37, n. 3, p. 420-9, Mar 2011.

KANCZKOWSKI, W. et al. Hypothalamo-pituitary and immune-dependent adrenal regulation during systemic inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 36, p. 14801-6, Sep 2013.

KAUSHIK, D. K. et al. Interleukin-1beta orchestrates underlying inflammatory responses in microglia via Kruppel-like factor 4. **J Neurochem**, v. 127, n. 2, p. 233-44, Oct 2013.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiol Rev**, v. 91, n. 2, p. 461-553, Apr 2011.

KIM, R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 333, n. 2, p. 336-43, Jul 2005.

KOBAYASHI, K. et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e525, Mar 2013.

KORCOK, J. et al. Sepsis inhibits reduction of dehydroascorbic acid and accumulation of ascorbate in astroglial cultures: intracellular ascorbate depletion increases nitric oxide synthase induction and glutamate uptake inhibition. **J Neurochem**, v. 81, n. 1, p. 185-93, Apr 2002.

KUBOTERA, H. et al. Astrocytic endfeet re-cover blood vessels after removal by laser ablation. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 1263, Feb 4 2019.

KUNO, R. et al. Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor-alpha. **J Neuroimmunol**, v. 162, n. 1-2, p. 89-96, May 2005.

KUPERBERG, S. J.; WADGAONKAR, R. Sepsis-Associated Encephalopathy: The Blood-Brain Barrier and the Sphingolipid Rheostat. **Front Immunol**, v. 8, p. 597, 2017.

LANGOUCHE, L.; VAN DEN BERGHE, G. The dynamic neuroendocrine response to critical illness. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 35, n. 4, p. 777-91, ix, Dec 2006.

LARYEA, G.; SCHUTZ, G.; MUGLIA, L. J. Disrupting hypothalamic glucocorticoid receptors causes HPA axis hyperactivity and excess adiposity. **Mol Endocrinol**, v. 27, n. 10, p. 1655-65, Oct 2013.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 6, p. a001651, Dec 2009.

LEAK, R. K.; MOORE, R. Y. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. **J Comp Neurol**, v. 433, n. 3, p. 312-34, May 7 2001.

LEBER, B.; LIN, J.; ANDREWS, D. W. Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. **Oncogene**, v. 29, n. 38, p. 5221-30, Sep 2010.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Med**, v. 29, n. 4, p. 530-8, Apr 2003.

LEWIS, D. H. et al. The immunopathology of sepsis: pathogen recognition, systemic inflammation, the compensatory anti-inflammatory response, and regulatory T cells. **J Vet Intern Med**, v. 26, n. 3, p. 457-82, May-Jun 2012.

LI, Y. et al. Neuronal-glial interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. **J Neurosci**, v. 20, n. 1, p. 149-55, Jan 1 2000.

LIVELY, S.; SCHLICHTER, L. C. Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFNgamma+TNFalpha) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). **Front Cell Neurosci**, v. 12, p. 215, 2018.

MACHADO, F. R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 11, p. 1180-1189, Nov 2017.

MANGIAPANE, M. L. et al. Role for the subfornical organ in vasopressin release. **Brain Res Bull**, v. 13, n. 1, p. 43-7, Jul 1984.

MAXIME, V.; SIAMI, S.; ANNANE, D. Metabolism modulators in sepsis: the abnormal pituitary response. **Crit Care Med**, v. 35, n. 9 Suppl, p. S596-601, Sep 2007.

MAZERAUD, A. et al. Neuroanatomy and Physiology of Brain Dysfunction in Sepsis. **Clin Chest Med**, v. 37, n. 2, p. 333-45, Jun 2016.

MCCAFFREY, G.; DAVIS, T. P. Physiology and pathophysiology of the blood-brain barrier: P-glycoprotein and occludin trafficking as therapeutic targets to optimize central nervous system drug delivery. **J Investig Med**, v. 60, n. 8, p. 1131-40, Dec 2012.

MERCAU, M. E. et al. Moderate Exercise Prevents Functional Remodeling of the Anterior Pituitary Gland in Diet-Induced Insulin Resistance in Rats: Role of Oxidative Stress and Autophagy. **Endocrinology**, v. 157, n. 3, p. 1135-45, Mar 2016.

MESSARIS, E. et al. Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death prolongs survival in sepsis. **Crit Care Med**, v. 32, n. 8, p. 1764-70, Aug 2004.

MICHELS, M. et al. Characterization and modulation of microglial phenotypes in an animal model of severe sepsis. **J Cell Mol Med**, v. 24, n.1, 88-97, 2019.

_____. Mechanisms of long-term cognitive dysfunction of sepsis: from blood-borne leukocytes to glial cells. **Intensive Care Med Exp**, v. 3, n. 1, p. 30, 2015a.

_____. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. **Brain Behav Immun**, v. 43, p. 54-9, 2015b.

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

MIKHAYLOVA, I. V. et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates steroidogenesis, apoptosis, and cell viability in the human adrenocortical cell line NCI-H295R. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 386-92, Jan 2007.

MIYATA, S. New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. **Front Neurosci**, v. 9, p. 390, 2015.

MORAES, C. A. et al. Activated Microglia-Induced Deficits in Excitatory Synapses Through IL-1 β : Implications for Cognitive Impairment in Sepsis. **Mol Neurobiol**, Sep 2014.

MORRISON, H. W.; FILOSA, J. A. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. **J Neuroinflammation**, v. 10, p 4, 2013

NAKANO, Y. et al. Astrocytic TLR4 expression and LPS-induced nuclear translocation of STAT3 in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain. **J Neuroimmunol**, v. 278, p. 144-58, Jan 15 2015.

NEVES, F. S. et al. Brain-Defective Insulin Signaling Is Associated to Late Cognitive Impairment in Post-Septic Mice. **Mol Neurobiol**, Dec 2016.

NGUYEN, D. N. et al. High prolactin levels are associated with more delirium in septic patients. **J Crit Care**, v. 33, p. 56-61, Jun 2016.

NORDEN, D. M. et al. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. **Glia**, v. 64, n. 2, p. 300-16, Feb 2016.

O'CALLAGHAN, E. K. et al. Long-lasting effects of sepsis on circadian rhythms in the mouse. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47087, 2012.

OBERBECK, R. et al. Prolactin modulates survival and cellular immune functions in septic mice. **J Surg Res**, v. 113, n. 2, p. 248-56, Aug 2003.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R. et al. Cellular bioenergetics changes in magnocellular neurons may affect copeptin expression in the late phase of sepsis. **J Neuroimmunol**, v. 267, n. 1-2, p. 28-34, Feb 2014.

_____. Central NOS inhibition differentially affects vasopressin gene expression in hypothalamic nuclei in septic rats. **J Neuroimmunol**, v. 227, n. 1-2, p. 80-6, Oct 2010.

_____. Cleaved caspase-3 expression in hypothalamic magnocellular neurons may affect vasopressin secretion during experimental polymicrobial sepsis. **J Neuroimmunol**, v. 258, n. 1-2, p. 10-6, May 15 2013a.

_____. Oxytocin affects nitric oxide and cytokine production by sepsis-sensitized macrophages. **Neuroimmunomodulation**, v. 20, n. 2, p. 65-71, 2013b.

_____. Role of central NO-cGMP pathway in vasopressin and oxytocin gene expression during sepsis. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1847-52, Oct 2010.

_____. Thermoregulation and vasopressin secretion during polymicrobial sepsis. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 1, p. 45-53, Jan 2009.

OTT, D. et al. Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines. **Brain Res**, v. 1363, p. 93-106, Dec 2 2010.

PANCOTO, J. A. et al. Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture. **Auton Neurosci**, v. 138, n. 1-2, p. 57-63, Feb 2008.

PAOLI, C. J. et al. Epidemiology and Costs of Sepsis in the United States-An Analysis Based on Timing of Diagnosis and Severity Level. **Crit Care Med**, v. 46, n. 12, p. 1889-1897, Dec 2018.

PARK, E. J.; KWON, T. H. A Minireview on Vasopressin-regulated Aquaporin-2 in Kidney Collecting Duct Cells. **Electrolyte Blood Press**, v. 13, n. 1, p. 1-6, Jun 2015.

PICCIOTTO, M. R.; HIGLEY, M. J.; MINEUR, Y. S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 116-29, Oct 4 2012.

POLITO, A. et al. Changes in CRH and ACTH synthesis during experimental and human septic shock. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e25905, 2011.

_____. Hyperglycaemia and apoptosis of microglial cells in human septic shock. **Crit Care**, v. 15, n. 3, p. R131, 2011.

_____. et al. Pattern of brain injury in the acute setting of human septic shock. **Crit Care**, v. 17, n. 5, p. R204, Sep 18 2013.

PORTER, A. G.; JANICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 6, n. 2, p. 99-104, Feb 1999.

QUINTANO NEIRA, R. A.; HAMACHER, S.; JAPIASSU, A. M. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. **PLoS One**, v. 13, n. 4, p. e0195873, 2018.

RADA, P. et al. Interleukin-1 beta decreases acetylcholine measured by microdialysis in the hippocampus of freely moving rats. **Brain Res**, v. 550, n. 2, p. 287-90, Jun 7 1991.

REGHUNANDANAN, V.; REGHUNANDANAN, R. Neurotransmitters of the suprachiasmatic nuclei. **J Circadian Rhythms**, v. 4, p. 2, Feb 16 2006.

REIS, W. L. et al. Brain innate immunity regulates hypothalamic arcuate neuronal activity and feeding behavior. **Endocrinology**, v. 156, n. 4, p. 1303-15, Apr 2015.

REMICK, D. G. Pathophysiology of sepsis. **Am J Pathol**, v. 170, n. 5, p. 1435-44, May 2007.

REYES-LAGOS, J. J. et al. Exogenous oxytocin reduces signs of sickness behavior and modifies heart rate fluctuations of endotoxemic rats. **Physiol Behav**, v. 165, p. 223-30, Oct 15 2016.

RHEE, C. et al. Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009-2014. **JAMA**, v. 318, n. 13, p. 1241-1249, Oct 3 2017.

_____. Prevalence, Underlying Causes, and Preventability of Sepsis-Associated Mortality in US Acute Care Hospitals. **JAMA Netw Open**, v. 2, n. 2, p. e187571, Feb 1 2019.

RIAZI, K. et al. Microglial activation and TNFalpha production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 44, p. 17151-6, Nov 4 2008.

RODRIGUEZ, T. T. et al. Prolactin secretion in hypothyroid endotoxemic rats: involvement of L-arginine and nitric oxide synthase. **Shock**, v. 23, n. 5, p. 448-52, May 2005.

SALOMAO, R. et al. Sepsis: evolving concepts and challenges. **Braz J Med Biol Res**, v. 52, n. 4, p. e8595, 2019.

SAMSON, W. K.; FERGUSON, A. V. Exploring the OVLT: insight into a critically important window into the brain. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 309, n. 4, p. R322-3, Aug 15 2015.

SANTOS-JUNIOR, N. N. et al. Experimental sepsis induces sustained inflammation and acetylcholinesterase activity impairment in the hypothalamus. **J Neuroimmunol**, v. 324, p. 143-148, Nov 15 2018.

SAVIO, L. E. B. et al. P2X7 Receptor Signaling Contributes to Sepsis-Associated Brain Dysfunction. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 8, p. 6459-6470, Oct 2017.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **J Comp Neurol**, v. 218, n. 2, p. 121-44, Aug 1 1983.

SCHAFER, D. P. et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. **Neuron**, v. 74, n. 4, p. 691-705, May 2012.

SCHWALM, M. T. et al. Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. **Mol Neurobiol**, v. 49, n. 1, p. 380-5, Feb 2014.

SERGEYEV, V.; BROBERGER, C.; HOKFELT, T. Effect of LPS administration on the expression of POMC, NPY, galanin, CART and MCH mRNAs in the rat hypothalamus. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 90, n. 2, p. 93-100, Jun 20 2001.

SHAN, S. et al. Is functional state of spinal microglia involved in the anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of electroacupuncture in rat model of monoarthritis? **Neurobiol Dis**, v. 26, n. 3, p. 558-68, Jun 2007.

SHARSHAR, T. et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. **Lancet**, v. 362, n. 9398, p. 1799-805, Nov 2003.

_____. Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. **Crit Care Med**, v. 30, n. 3, p. 497-500, Mar 2002.

SHIH, R. H.; WANG, C. Y.; YANG, C. M. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. **Front Mol Neurosci**, v. 8, p. 77, 2015.

SIAMI, S. et al. Thirst perception and osmoregulation of vasopressin secretion are altered during recovery from septic shock. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80190, 2013.

SILVERMAN, A. J.; HOFFMAN, D. L.; ZIMMERMAN, E. A. The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). **Brain Res Bull**, v. 6, n. 1, p. 47-61, Jan 1981.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801-10, Feb 23 2016.

SMITH, P. M.; FERGUSON, A. V. Circulating signals as critical regulators of autonomic state-central roles for the subfornical organ. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 299, n. 2, p. R405-15, Aug 2010.

SOLDANI, C.; SCOVASSI, A. I. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. **Apoptosis**, v. 7, n. 4, p. 321-8, Aug 2002.

SONG, D. K. et al. Central injection of nicotine increases hepatic and splenic interleukin 6 (IL-6) mRNA expression and plasma IL-6 levels in mice: involvement of the peripheral sympathetic nervous system. **FASEB J**, v. 13, n. 10, p. 1259-67, Jul 1999.

SONG, D. K. et al. Central injection of nitric oxide synthase inhibitors increases peripheral interleukin-6 and serum amyloid A: involvement of adrenaline from adrenal medulla. **Br J Pharmacol**, v. 130, n. 1, p. 41-8, May 2000.

STARE, J. et al. Effects of Peritoneal Sepsis on Rat Central Osmoregulatory Neurons Mediating Thirst and Vasopressin Release. **J Neurosci**, v. 35, n. 35, p. 12188-97, Sep 2 2015.

STOOP, R. Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 142-59, Oct 04 2012.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nat Rev Immunol**, v. 19, n. 8, p. 477-489, Aug 2019.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. **J Clin Invest**, v. 107, n. 1, p. 7-11, Jan 2001.

TAKAHASHI, K.; ROCHFORD, C. D.; NEUMANN, H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. **J Exp Med**, v. 201, n. 4, p. 647-57, Feb 2005.

THERET, M.; MOUNIER, R.; ROSSI, F. The origins and non-canonical functions of macrophages in development and regeneration. **Development**, v. 146, n. 9, May 2 2019.

TIKKA, T. et al. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. **J Neurosci**, v. 21, n. 8, p. 2580-8, Apr 2001.

TOKITA, K.; INOUE, T.; BOUGHTER, J. D., JR. Afferent connections of the parabrachial nucleus in C57BL/6J mice. **Neuroscience**, v. 161, n. 2, p. 475-88, Jun 30 2009.

TOM, N.; ASSINDER, S. J. Oxytocin in health and disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 2, p. 202-5, Feb 2010.

TONG, Y.; PELLETIER, G. Prolactin regulation of pro-opiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. **Neuroendocrinology**, v. 56, n. 4, p. 561-5, Oct 1992.

TRENTZSCH, H. et al. The combination of polymicrobial sepsis and endotoxin results in an inflammatory process that could not be predicted from the independent insults. **J Surg Res**, v. 111, n. 2, p. 203-8, May 2003.

UENO, M. et al. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 5, p. 543-51, May 2013.

VALTORTA, F. et al. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? **Bioessays**, v. 26, n. 4, p. 445-53, Apr 2004.

VARDAS, K. et al. Increased glucocorticoid receptor expression in sepsis is related to heat shock proteins, cytokines, and cortisol and is associated with increased mortality. **Intensive Care Med Exp**, v. 5, n. 1, p. 10, Dec 2017.

VENKATESH, B. et al. Elevated plasma-free cortisol concentrations and ratios are associated with increased mortality even in the presence of statin therapy in patients with severe sepsis. **Crit Care Med**, v. 43, n. 3, p. 630-5, Mar 2015.

VOET, S.; PRINZ, M.; VAN LOO, G. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. **Trends Mol Med**, v. 25, n. 2, p. 112-123, Feb 2019.

VOLBEDA, M. et al. Glucocorticosteroids for sepsis: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. **Intensive Care Med**, v. 41, n. 7, p. 1220-34, Jul 2015.

VRANG, N.; LARSEN, P. J.; MIKKELSEN, J. D. Direct projection from the suprachiasmatic nucleus to hypophysiotrophic corticotropin-releasing factor immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus demonstrated by means of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin tract tracing. **Brain Res**, v. 684, n. 1, p. 61-9, Jun 26 1995.

WAHAB, F. et al. Interleukin-1 receptor antagonist decreases cerebrospinal fluid nitric oxide levels and increases vasopressin secretion in the late phase of sepsis in rats. **Endocrine**, v. 49, n. 1, p. 215-21, May 2015.

_____. Interleukin-1 Receptor Antagonist Decreases Hypothalamic Oxidative Stress During Experimental Sepsis. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 6, p. 3992-3998, Aug 2016.

WANG, J.; CIOFI, P.; CROWLEY, W. R. Neuropeptide Y suppresses prolactin secretion from rat anterior pituitary cells: evidence for interactions with dopamine through inhibitory coupling to calcium entry. **Endocrinology**, v. 137, n. 2, p. 587-94, Feb 1996.

WANG, Y. et al. A bed nucleus of stria terminalis microcircuit regulating inflammation-associated modulation of feeding. **Nat Commun**, v. 10, n. 1, p. 2769, Jun 24 2019.

WEBSTER, J. I.; STERNBERG, E. M. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids and glucocorticoid receptors in toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products. **J Endocrinol**, v. 181, n. 2, p. 207-21, May 2004.

WILLARD, L. B.; HAUSS-WEGRZYNIAK, B.; WENK, G. L. Pathological and biochemical consequences of acute and chronic neuroinflammation within the basal forebrain cholinergic system of rats. **Neuroscience**, v. 88, n. 1, p. 193-200, Jan 1999.

YAMASHITA, H. et al. Interleukin-18 Reduces Blood Glucose and Modulates Plasma Corticosterone in a Septic Mouse Model. **Shock**, v. 47, n. 4, p. 455-462, Apr 2017.

YANG, Y. et al. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. **Cell Death Dis**, v. 10, n. 2, p. 128, Feb 12 2019.

YASIN, S. A. et al. Interleukin-1 beta and interleukin-6 stimulate neurohypophysial hormone release in vitro. **J Neuroendocrinol**, v. 6, n. 2, p. 179-84, Apr 1994.

YOUNG, K.; MORRISON, H. Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. **J Vis Exp**, n. 136, Jun 5 2018.

ZHANG, S. et al. Sepsis-induced selective loss of NMDA receptors modulates hippocampal neuropathology in surviving septic mice. **PLoS One**, v. 12, n. 11, p. e0188273, 2017.

APÊNDICE

Vasopressin Impairment During Sepsis Is Associated with Hypothalamic Intrinsic Apoptotic Pathway and Microglial Activation

Luis Henrique Angenendt da Costa¹ · Nilton Nascimento dos Santos Júnior¹ · Carlos Henrique Rocha Catalão¹ · Tarek Sharshar² · Fabrice Chrétien² · Maria José Alves da Rocha³

Received: 21 March 2016 / Accepted: 1 September 2016 / Published online: 8 September 2016
 © Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Previous studies have shown that in the early phase of sepsis, the plasma concentration of arginine vasopressin (AVP) is increased, but in the late phase, its levels remain inadequately low, despite of persistent hypotension. One hypothesis suggested for this relative deficiency is apoptosis of vasopressinergic neurons. Here, we investigated apoptosis pathways in the hypothalamus during sepsis, as well as mechanisms underlying this process. Male Wistar rats were submitted to sepsis by cecal ligation and puncture (CLP) or nonmanipulated (naïve) as control. After 6 and 24 h, the animals were decapitated and brain and blood were collected to assess hypothalamic apoptotic markers, IFN- γ plasma levels, and evidence for breakdown of the blood-brain barrier (BBB). Sepsis caused a decrease in mitochondrial antiapoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xL) in the hypothalamus, but had no effect on markers of cell death mediated by death receptors or immune cells. In the supraoptic nuclei of these animals, microglia morphology was consistent with activation, associated with an increase in plasma IFN- γ . A transitory breakdown of BBB in the hypothalamus was seen at 6 h following CLP. The results indicate that the intrinsic but not extrinsic apoptosis pathway is involved in the cell death observed in

vasopressinergic neurons, and that this condition is temporally associated with microglial activation and BBB leaking.

Keywords Neuroendocrine dysfunction · Neuroinflammation · Blood-brain barrier · Cell death

Introduction

The pathophysiology of sepsis comprises a complex immunological response that, although essential to combat the infection, is also responsible for deleterious effects. The inflammatory agents produced by immune cells in the infection site or in the blood can directly or indirectly reach the central nervous system (CNS). There they can lead to a cerebral dysfunction denominated sepsis-associated encephalopathy (SAE), resulting in cognitive, autonomic, and endocrine impairment [1–3]. Regarding neuroendocrine changes during sepsis, our group has focused its investigation on arginine vasopressin (AVP) secretion, an important vasopressor peptide synthesized in the supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nuclei of the hypothalamus. By using cecal ligation and puncture as an experimental model of sepsis induction, we saw a drop in blood pressure and increase in plasma vasopressin following 4–6 h of surgery. However, 24 h after sepsis induction, the circulating levels of the hormone remain low, despite of persistent hypotension [4–8]. Moreover, at this time, we saw an impairment in magnocellular activation and increase in some markers of oxidative stress that could result in apoptosis of AVP-producing neurons [7, 9, 10].

Apoptosis, a form of programmed cell death, is an ATP-dependent highly complex process that comprises a sophisticated cascade of molecular events [11]. The key elements in apoptosis are caspases, a family of cysteine proteases that, once cleaved, become activated and initiate a proteolytic

✉ Maria José Alves da Rocha
 mjrocha@forp.usp.br

¹ Department of Neurosciences and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

² Infection and Epidemiology Department, Institut Pasteur Human Histopathology and Animal Models Unit, Paris, France

³ Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenida do Café s/n, CEP, Ribeirão Preto 14040-904, Brazil