

ISMAEL PÉREZ FLORES

**Efeito das catelicidinas na neuroinflamação tardia em modelo
experimental de sepse**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos imunes e
infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Pinheiro da Silva



São Paulo

2022

ISMAEL PÉREZ FLORES

**Efeito das catelicidinas na neuroinflamação tardia em modelo
experimental de sepse**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos imunes e
infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Pinheiro da Silva



São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Flores, Ismael Pérez
Efeito das catelicidinas na neuroinflamação
tardia em modelo experimental de sepse / Ismael
Pérez Flores. -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Imunes e Infecciosos.
Orientador: Fabiano Pinheiro da Silva.

Descritores: 1.Neuroinflamação 2.Neuropeptídeos
3.Catelicidinas 4.Citocinas 5.Sepse 6.Encefalopatia

USP/FM/DBD-213/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Esforço-me para que eles sejam
fortalecidos em
seu coração, estejam unidos em amor
e
alcancem toda a riqueza do pleno
entendimento,
a fim de conhecerem plenamente o
mistério de
Deus, a saber, Cristo. Nele estão
escondidos
todos os tesouros da sabedoria e do
conhecimento.

Colossenses 2: 2-3

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus** pela vida, pela minha família, por dar-me saúde e o privilégio de poder seguir adiante em meus objetivos pessoais e profissionais. Apesar de todas as dificuldades e momentos de frustrações, sempre colocou em meu caminho pessoas que me incentivaram e me ajudaram a seguir adiante.

Ao **Prof. Fabiano Pinheiro da Silva**, pelos ensinamentos, pelo incentivo e pela paciência a mim concedidos, bem como por ter me ensinado o significado da palavra disciplina e que, com todo o seu conhecimento e elevado nível científico, sempre me proporcionou a orientação, o apoio e, sobretudo, o exemplo como professor e pesquisador.

À meu pai, **Ismael Pérez Zeballos**, pelo exemplo como ser humano e como profissional. O verdadeiro significado da palavra resiliência. A ele, todo o meu reconhecimento como médico, homem trabalhador e pai de família.

À minha mãe, **Aida Lúcia Flores de Pérez**, pela sabedoria, amor incondicional e pela incansável dedicação à família que, desde a minha infância, nunca hesitou em sacrificar os seus próprios sonhos para permitir que eu alcançasse os meus. O amor personificado.

Ao meu irmão, **Israel Rodrigo Flores Pérez**, pelo privilégio de poder ter crescido ao seu lado mostrando-me sempre o significado de amizade, lealdade, paciência e, principalmente, pela devoção ao nosso Senhor. Obrigado, amado irmão.

À minha noiva, **Flávia Souza Carneiro**, por todo o apoio a mim oferecido das mais diferentes maneiras e, muitas vezes, por ter me acompanhado em minhas renúncias para que eu alcance este objetivo.

À **Suely Kubo Ariga**, pela paciência e por ter me ensinado cada etapa dos processos no laboratório e os primeiros experimentos que foram fundamentais para que esta pesquisa fosse realizada.

Meu muito obrigado à **Hermes Barbeiro** e à **Denise Barbeiro** pelas conversas descontraídas, pelos ensinamentos e pela colaboração com os experimentos, sem os quais eu jamais teria concluído este trabalho. Muito obrigado.

À **Thaís Martins de Lima**, à Sra. **Kelly Gouvêia** e ao Sr. **Geraldo**, por todo o suporte concedido e por sempre estarem disponíveis para colaborar com meu projeto durante o período em que estive realizando os experimentos.

Aos meus colegas: **Rafael Abadessa**, **Alana Bazán**, **Ewerton Macarini**, **Beatriz**, **Lucy** e **Neuza**, do grupo de pesquisa. Observar vocês realizando seus trabalhos sempre foi-me motivador para seguir adiante com minha investigação. Obrigado pela simpatia que sempre me foi oferecida.

À Sra. **Angélica** e à Sra. **Rose** que sempre esclareceram todas as minhas dúvidas e atenderam a todas as minhas solicitações com prontidão e da maneira mais precisa possível.

À **FAPESP** e à **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, pelo fomento à pesquisa mesmo nos momentos de maior adversidade, como durante a pandemia.

“A ciência de maneira nenhuma nega a existência de Deus.
Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o
homem compreende, pesquisa e consegue realizar,
então reconheço claramente que o espírito humano é
obra de Deus, e a mais notável”

Galileu Galilei

Normatização Adotada

Essa dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

Referências: adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Fredd, Maria F. Crestana, Marinalva de Sousa Araújo, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3a Ed. São Paulo. Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviação dos títulos dos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | Introdução | 1 |
| | 1.1 Disfunção neurológica na sepse..... | 3 |
| | 1.2 Mecanismos das alterações cognitivas relacionadas à sepse..... | 5 |
| | 1.3 Neuropeptídeos e Inflamação Sistêmica..... | 8 |
| | 1.4 Catelicidinas e sepse..... | 15 |
| 2 | Objetivos | |
| | 2.1 Objetivo geral..... | 18 |
| | 2.2 Objetivos específicos..... | 18 |
| 3 | Materiais e Métodos | |
| | 3.1 Local de experimentação..... | 19 |
| | 3.2 Aspectos éticos..... | 19 |
| | 3.3 Animais de experimentação e grupos experimentais..... | 19 |
| | 3.4 Modelo de ligadura e punção cecal..... | 20 |
| | 3.5 Técnica de coleta de tecidos..... | 21 |
| | 3.6 Dosagem de neuropeptídeos e citocinas inflamatórias no material coletado..... | 22 |
| | 3.7 Análise estatística..... | 23 |
| 4 | Resultados | 24 |
| | 4.1 Citocinas inflamatórias em plasma..... | |
| | 4.1.1 Interleucina- 1β | 25 |
| | 4.1.2 Interleucina-6..... | 26 |
| | 4.1.3 Interleucina-10..... | 28 |
| | 4.1.4 Proteína Quimiotática de Monócitos -1..... | 29 |
| | 4.1.5 Fator de Necrose Tumoral – α | 30 |
| | 4.2 Neuropeptídeos em hipocampo..... | |
| | 4.2.1 Neurotensina em hipocampo..... | 31 |
| | 4.2.2 Oxitocina em hipocampo..... | 32 |
| | 4.2.3 β -endorfina em hipocampo..... | 33 |
| | 4.2.4 Substância P em hipocampo..... | 34 |
| | 4.3 Neuropeptídeos em córtex pré-frontal..... | |
| | 4.3.1 Neurotensina em córtex pré-frontal..... | 35 |
| | 4.3.2 β -endorfina em córtex pré-frontal..... | 36 |
| | 4.3.3 Oxitocina em córtex pré-frontal..... | 37 |
| | 4.3.4 Substância P em córtex pré-frontal..... | 38 |
| 5 | Discussão | 40 |
| 6 | Conclusões | 46 |

| | | |
|----------|-------------------------|-----------|
| 7 | Anexos..... | 47 |
| 8 | Referências..... | 49 |

Lista de Abreviaturas e Símbolos

| | |
|---------------|---|
| α -MSH | Fator estimulante de Melanócitos - α |
| α -TNF | Fator de necrose tumoral - α |
| AMPs | Peptídeos antimicrobianos |
| CGRP | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina |
| CLP | Cecal ligation and puncture |
| CRAMP | Cathelin-related antimicrobial peptide |
| CRAMP-KO | Knock-out CRAMP |
| DAMP | Padrões moleculares associados ao dano |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| HMGB-1 | High mobility group Box-1 |
| IL-1 β | Interleucina-1 β |
| IL-2 | Interleucina-2 |
| IL-4 | Interleucina-4 |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IL-10 | Interleucina-10 |
| INF- γ | Interferon gama |
| LL-37 | Leucina-leucina 37 |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MCP-1 | Monocyte chemoattractant protein-1 |
| MIP-2 | Macrophage inflammatory protein-2 |
| NK-1R | Receptor da neurocinina-1 |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| NSE | Enolase neurônio específica |
| NOP | Receptor de nociceptina/orfanina FQ |
| NPY | Neuropeptídeo Y |

| | |
|----------|--|
| NTS-1 | Receptor de neurotensina-1 |
| NTS-2 | Receptor de neurotensina-2 |
| N/OFQ | Nociceptina/Orfanina FQ |
| pg/mL | Picogramas por mililitro |
| pg/mL/mg | Picogramas por mililitro por miligrama |
| PPT-A | Pré-protaquinina A |
| RNAm | RNA mensageiro |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SP | Substância P |
| UTI | Unidade de terapia intensiva |
| WT | Wild-type |

Lista de Figuras

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Desfechos de sobreviventes à sepse..... | 3 |
| Figura 2 | Mecanismo do deterioro cognitivo após a sepse..... | 7 |
| Figura 3 | Papel dos neuropeptídeos na sepse..... | 10 |
| Figura 4 | Esquema do estudo e grupos de animais..... | 22 |
| Figura 5 | Comparação de sobrevida entre WT-15 dias e KO-15 dias | 25 |
| Figura 6 | Dosagem de Interleucina 1- β em plasma..... | 26 |
| Figura 7 | Dosagem de Interleucina 6 em plasma..... | 27 |
| Figura 8 | Dosagem de Interleucina 10 em plasma..... | 28 |
| Figura 9 | Dosagem de MCP-1 em plasma..... | 29 |
| Figura 10 | Dosagem de TNF- α em plasma..... | 31 |
| Figura 11 | Dosagem de Neurotensina em hipocampo..... | 32 |
| Figura 12 | Dosagem de Oxitocina em hipocampo..... | 33 |
| Figura 13 | Dosagem de β -endorfina em hipocampo..... | 34 |
| Figura 14 | Dosagem de Substância P em hipocampo..... | 35 |
| Figura 15 | Dosagem de Neurotensina em córtex pré-frontal..... | 36 |
| Figura 16 | Dosagem de β -endorfina em córtex pré-frontal..... | 37 |
| Figura 17 | Dosagem de Oxitocina em córtex pré-frontal..... | 38 |
| Figura 18 | Dosagem de Substância P em córtex pré-frontal..... | 39 |

RESUMO

Pérez FI. *Efeito das catelicidinas na neuroinflamação tardia em modelo experimental de sepse* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: A redução da mortalidade por sepse, observada nos últimos anos, levou a um aumento importante no número de indivíduos com complicações crônicas por esta doença. A disfunção cognitiva a longo prazo é uma das principais alterações presentes nestes indivíduos, estando relacionada a diversos distúrbios no sistema nervoso central e compondo a denominada encefalopatia séptica, que têm na neuroinflamação uma parte central do seu mecanismo fisiopatológico. Os neuropeptídeos e as catelicidinas, neste contexto, são peptídeos com importante papel no sistema imunológico e na resposta inflamatória, tendo uma participação fundamental no processo neuroinflamatório. **Metodologia:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das catelicidinas na neuroinflamação precoce e tardia em modelo experimental de sepse, utilizando camundongos selvagens e deficientes em CRAMP. Para atingirmos este objetivo, foram mensuradas diversas citocinas no plasma destes animais, e foram dosados diversos neuropeptídeos no hipocampo e no córtex pré-frontal dos mesmos, antes e após sepse experimental. **Resultados:** Foram identificados níveis mais elevados de IL-6 e MCP-1 no plasma dos animais selvagens, 24 horas após a indução do modelo de sepse (ligadura e punção cecal), em comparação aos animais CRAMP "knockout". Maiores níveis de neurotensina e substância P foram detectados no hipocampo dos animais selvagens, tanto nos controles saudáveis, quanto 24 horas após indução de sepse, quando comparados aos animais deficientes em CRAMP. Não foi observado nenhuma diferença significativa nas dosagens dos neuropeptídeos no córtex pré-frontal, em todos os grupos analisados. **Conclusões:** Os nossos achados sugerem que as catelicidinas exacerbam a resposta inflamatória, ocasionando elevação nos níveis plasmáticos de algumas citocinas e nos níveis de substância P e neurotensina no hipocampo, mas não no córtex pré-frontal.

Descritores: Neuroinflamação; Neuropeptídeos; Catelicidinas; Citocinas; Sepse; Encefalopatia.

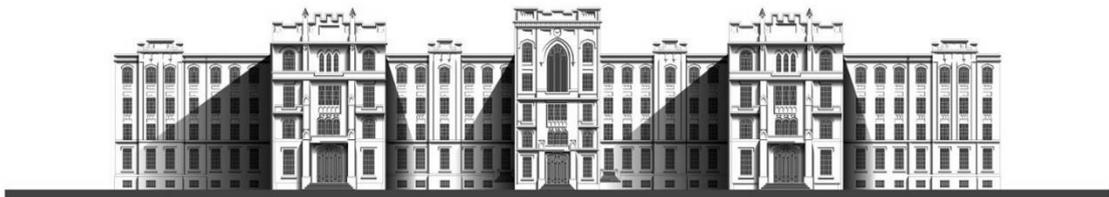
ABSTRACT

Pérez FI. *Effect of cathelicidin on late neuroinflammation in an experimental model of sepsis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Introduction: The reduction in mortality from sepsis, observed in recent years, has led to a significant increase in the number of individuals with chronic complications from this disease. Long-term cognitive dysfunction is one of the main alterations present in these individuals, being related to several disorders in the central nervous system and composing the so-called septic encephalopathy, which have neuroinflammation as a central part of their pathophysiological mechanism. Neuropeptides and cathelicidins, in this context, are peptides with an important role in the immune system and in the inflammatory response, having a fundamental role in the neuroinflammatory process. **Methodology:** The objective of this work was to evaluate the effect of cathelicidins on early and late neuroinflammation in an experimental model of sepsis, using wild-type and CRAMP-deficient mice. To achieve this objective, several cytokines were measured in the plasma of these animals, and several neuropeptides were measured in their hippocampus and prefrontal cortex, before and after experimental sepsis. **Results:** Higher levels of IL-6 and MCP-1 were identified in the plasma of wild animals, 24 hours after the induction of the sepsis model (cecal ligation and puncture), compared to CRAMP-knockout animals. Higher levels of neurotensin and substance P were detected in the hippocampus of wild animals, both in healthy controls and 24 hours after induction of sepsis, when compared to CRAMP-deficient animals. No significant difference was observed in the levels of neuropeptides in the prefrontal cortex in all groups analyzed. **Conclusions:** Our findings suggest that cathelicidins exacerbate the inflammatory response, causing an increase in the plasma levels of some cytokines and in the levels of substance P and neurotensin in the hippocampus, but not in the prefrontal cortex.

Keywords: Neuroinflammation; Neuropeptides; Cathelicidins; Cytokines; Sepsis; Encephalopathy.

Introdução



1. Introdução

A sepse é uma entidade clínica frequente e caracterizada pela presença de uma ou mais disfunções orgânicas, potencialmente fatais, desencadeadas por uma resposta desregulada do organismo ante uma infecção. No extremo do espectro clínico da sepse, o choque séptico consiste em um conjunto de anormalidades na microcirculação e no metabolismo celular, o que incrementa substancialmente o risco de morte ¹.

Aproximadamente 19,4 milhões de pacientes desenvolvem sepse a cada ano no mundo, com uma mortalidade absoluta ao redor de 5,3 milhões, de modo que, anualmente, 14,1 milhões sobrevivem no momento da alta hospitalar ². No Brasil, a mortalidade absoluta por causas relacionadas a sepse também apresentou um expressivo incremento na última década, mostrando um aumento na notificação dessa doença como uma das principais causas de óbito no país ³.

A pesar do maior reconhecimento da sepse como uma das maiores causas de morte e da sua importância global como problema de saúde, tanto a incidência mundial de sepse como a mortalidade por ela vêm diminuindo ao longo dos anos ^{4 5}, em uma tendência que se repete em países desenvolvidos como Austrália e Nova Zelândia ⁶, EUA ⁷ e, inclusive, em países em desenvolvimento como o Brasil ⁸. No ano de 2017, foi estimado

aproximadamente 48,9 milhões de casos de sepse ao redor do mundo, com uma redução de 18,8% na incidência mundial de 1990 a 2017. Em relação à mortalidade, foi estimado um total de 11 milhões de mortes relacionadas à sepse no ano de 2017, sendo observada uma redução mundial de 29,7% na mortalidade absoluta por sepse de 1990 (15,7 milhões de mortes) a 2017 ⁵.

Aproximadamente metade dos pacientes que sobrevivem à sepse tem uma completa ou quase completa recuperação. Cerca de 1/6 dos indivíduos que sobrevivem à sepse apresenta uma limitação física persistente ou disfunção cognitiva e, 1/3 dos sobreviventes, evolui a óbito durante o ano seguinte à sepse. Metade das mortes que ocorrem 1 ano após a hospitalização por sepse deve-se a complicações da doença, enquanto que a outra metade é explicada por fatores como a idade e comorbidades dos indivíduos antes da hospitalização (Figura 1) ⁹.

Estes indivíduos que sobrevivem à sepse e não apresentam uma completa recuperação estão expostos a uma série de alterações a longo prazo, quais sejam: incremento no risco de doença arterial coronariana ¹⁰, incremento na incidência de estresse pós-traumático ¹¹, disfunção cognitiva a longo prazo, limitação funcional ¹² e maior mortalidade tardia ¹³. O conjunto destas alterações tardias, vistas nos pacientes que sobrevivem à sepse, pode ser denominado de Síndrome Pós-Sepse, e engloba diversos pontos, difíceis de delimitar, que incluem características do próprio indivíduo, comorbidades e sequelas da própria doença ⁹.

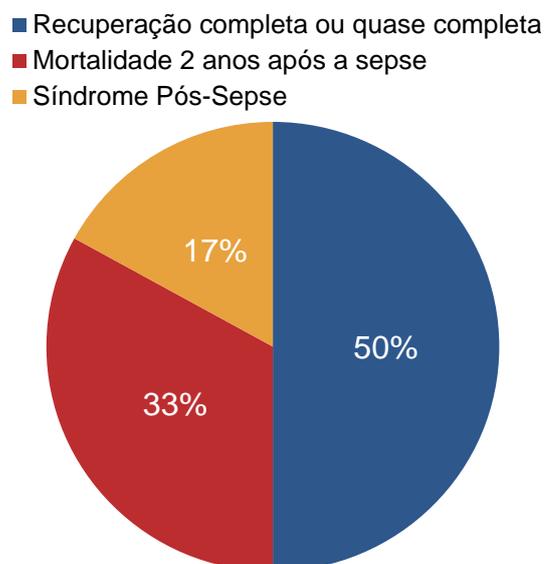


Figura 1 - Desfechos de pacientes após a sepse

Metade dos pacientes que sobrevivem à sepse alcançam uma completa ou quase completa recuperação em 2 anos após a alta hospitalar. Um terço dos pacientes morre ao longo deste período e 1/6 dos pacientes evoluem com complicações tardias e Síndrome Pós-Sepse. Modificado de Zachary Mostel e col. Post-sepsis syndrome – an evolving entity that afflicts survivors of sepsis. *Molecular Medicine*. 2020; 26:6.

1.1 Disfunção neurológica na sepse

A disfunção cerebral aguda ocorre em aproximadamente metade dos pacientes no momento de admissão na UTI por sepse, e apresenta um amplo espectro de manifestações que variam desde o delirium ao coma. Este conjunto de alterações neurológicas é denominada por Encefalopatia Associada à Sepse e tem, como principais características fisiopatológicas, a disfunção cerebral difusa e as alterações estruturais no sistema nervoso central (SNC) causadas pela resposta inflamatória sistêmica ¹⁴. Foram identificados neuropeptídeos que podem estar diretamente relacionados à disfunção cerebral e à inflamação sistêmica ¹⁵.

Em uma etapa mais tardia da sepse, a disfunção cognitiva a longo prazo representa um dos principais fatores associados à morbidade e à piora de

qualidade de vida entre os que sobrevivem à sepse. Uma coorte retrospectiva observou um aumento em 10,6% na prevalência de disfunção cognitiva de moderada à severa e um incremento de 1,57 novas limitações funcionais entre pacientes que são dados de alta após hospitalização por sepse ¹².

Diversos fatores podem estar associados ao desfecho cognitivo a longo prazo como: o status cognitivo prévio a sepse, comorbidades, magnitude da resposta inflamatória e características individuais. Uma coorte prospectiva identificou que níveis séricos elevados de NSE (enolase neurônio específica), INF- γ (interferon gama) e IL-6 (interleucina-6) 24 horas após a alta da UTI estão associados a um pior desfecho cognitivo 1 ano após a internação hospitalar ¹⁶. Nesse aspecto, é importante ressaltar que, em sobreviventes à sepse, foi encontrado um persistente aumento de marcadores inflamatórios como proteína C reativa e IL-6 até 1 ano após a alta hospitalar ¹⁷, o que pode estar relacionado a um pior resultado cognitivo a longo prazo entre estes pacientes ¹⁸.

Alguns marcadores de lesão neuronal são resultado do depósito de proteínas no parênquima cerebral como consequência da resposta inflamatória sistêmica, e podem estar associados a um pobre desfecho cognitivo relacionado à sepse. Entre estes marcadores, cabe mencionar a NSE, forma neuronal da enzima enolase da via glicolítica, sendo exclusivamente encontrada em neurônios e células neuroendócrinas ¹⁹; as Proteínas Tau, abundantes no SNC e que têm a função de estabilizar os microtúbulos ²⁰; as Proteínas β -amilóide, normalmente eliminadas pelas células da glia e que podem se acumular em placas levando a degeneração neuronal após desencadear uma resposta inflamatória na microglia ²¹; e as proteínas S100 β , produzidas pelos astrócitos, e

que podem ser encontradas em níveis elevados no sangue após um dano neurológico ²².

Um estudo observacional evidenciou maiores concentrações de NSE e S100 β no plasma e no líquido cefalorraquidiano de humanos com encefalopatia relacionada à sepse em relação a pacientes internados em UTI por outros motivos ²³. Por outro lado, em modelos experimentais de sepse, a administração de LPS em ratos esteve associada a um acúmulo de proteína β -Amilóide e de Tau fosforilado no cérebro dos animais, estando este aumento relacionado ao acúmulo de citocinas inflamatórias no parênquima cerebral ²⁴. Assim, este aumento no depósito de proteínas cerebrais, uma importante consequência da neuroinflamação, pode estar associado ao desenvolvimento da disfunção cognitiva a longo prazo nos pacientes que sobrevivem à inflamação sistêmica como consequência de uma infecção grave.

1.2 Mecanismo das alterações cognitivas relacionadas à sepse

Os mecanismos que levam às sequelas neurológicas relacionadas à sepse envolvem uma combinação de alterações como injúria cerebrovascular, desarranjos metabólicos e neuroinflamação. A fase aguda da sepse é marcada por variações abruptas da pressão arterial que resultam em hemorragia e isquemia no parênquima cerebral ⁹.

Algumas alterações frequentemente observadas na fase aguda da sepse decorrentes de desregulação do metabolismo, como a hiperglicemia e a uremia, também contribuem para as alterações cognitivas da sepse ⁹. Compostos como a creatinina podem estimular os receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) e

inibir os receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) ²⁵. A hiperglicemia, por outra parte, pode levar a apoptose celular ²⁶, a ativação de metaloproteinases e a quebra da barreira hemato-encefálica ²⁷.

A ativação de células gliais com liberação de citocinas inflamatórias, radicais livres derivados de oxigênio e a liberação desregulada de glutamato representa o principal aspecto da neuroinflamação ²⁸. A inflamação persistente do SNC, na sepse, leva a um comprometimento da integridade da barreira hemato-encefálica e a um acúmulo de mediadores inflamatórios periféricos, o que leva a uma exacerbação e perpetuação da neuroinflamação ²⁹.

Em roedores submetidos a modelo experimental de sepse foi evidenciada uma auto- amplificação de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β nas primeiras horas da indução da sepse ³⁰, seguido da ruptura da barreira hemato-encefálica ³¹. Como consequência da resposta imune, DAMPs se unem a diferentes receptores, exacerbando a resposta imunológica do hospedeiro. HMGB-1 pode atuar no endotélio da microvascularização cerebral, levando a quebra da integridade da barreira hemato- encefálica e facilitando a entrada de mediadores inflamatórios ao parênquima cerebral ^{32 33} (Figura 2).

DISTÚRBO NEUROCOGNITIVO DA SEPSE

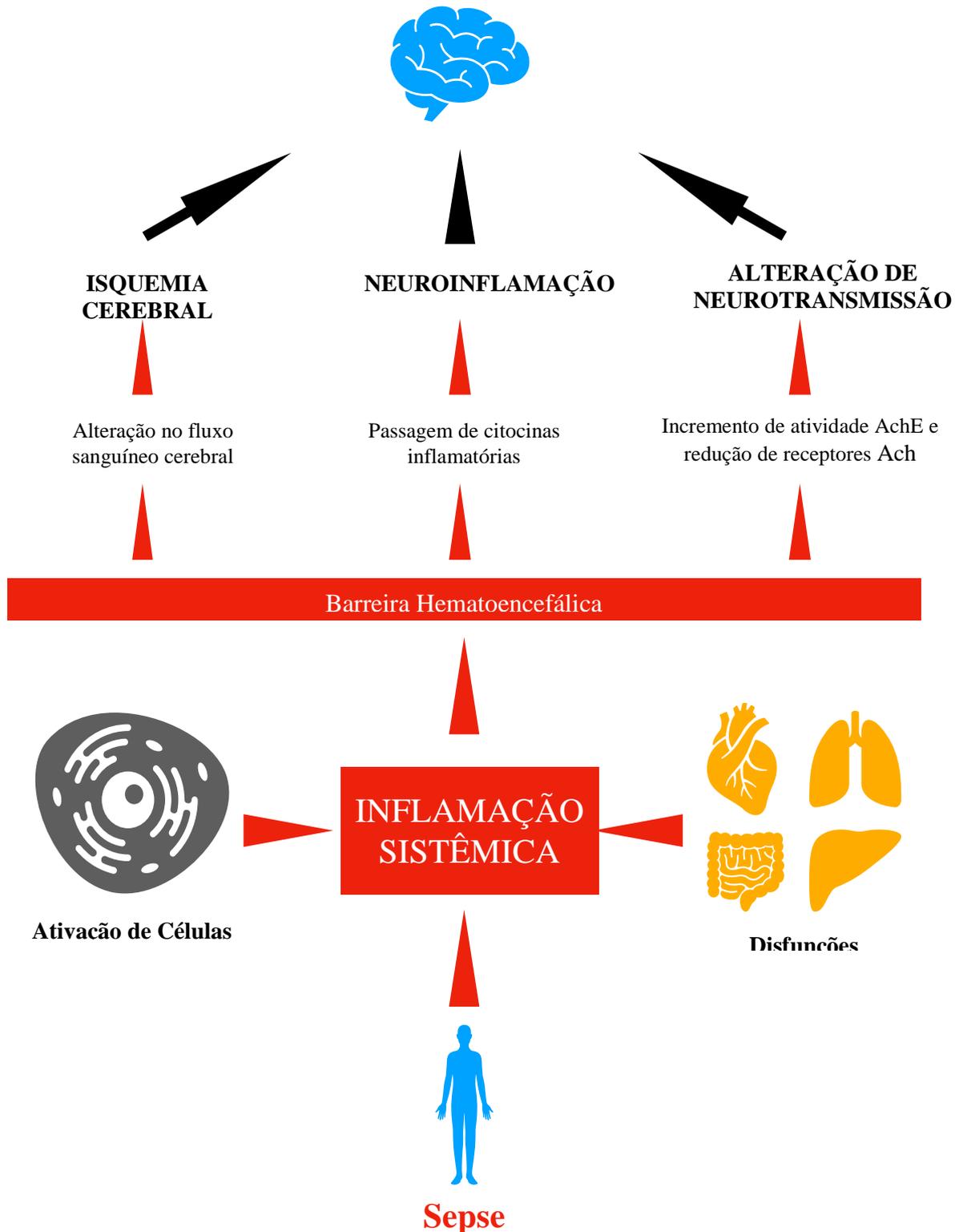


Figura 2 - Mecanismos do deterioro cognitivo após a sepse

Os efeitos neurocognitivos da sepse são causados por uma combinação de isquemia cerebral, disfunção neuronal e neuroinflamação. Modificado de Zachary Mostel e col. Post-sepsis syndrome – an evolving entity that afflicts survivors of sepsis. *Molecular Medicine*. 2020; 26:6.

1.3 Neuropeptídeos e inflamação sistêmica

Neuropeptídeos são pequenas sequências de aminoácidos produzidas, principalmente, mas não exclusivamente, no sistema nervoso central. Tipicamente, têm a função de regular a atividade neuronal e afetam uma grande variedade de funções centrais e periféricas, como a termorregulação, o comportamento sexual, a ingestão de água e de alimentos, o ritmo circadiano, entre outras. Os neuropeptídeos também são potenciais reguladores da resposta inflamatória e imune, uma vez que afetam a sensibilidade à dor, e são conhecidos por seu significativo papel na neurogênese, agindo não somente nos neurônios, mas também nas células gliais. As células da microglia expressam diversos neuropeptídeos e receptores de neurotransmissores que regulam a função glial³⁴. Desta forma, os neuropeptídeos estão envolvidos com diversas doenças neuropsiquiátricas incluindo a encefalopatia relacionada à sepse¹⁵.

A Substância P (SP), é uma taquicinina, composta de 11 aminoácidos, liberada pelas terminações nervosas em diversos tecidos³⁵. Estimula a liberação de citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e outros mediadores inflamatórios, estando relacionada ao incremento da permeabilidade capilar e ao extravasamento de líquido do intravascular ao interstício. A SP é amplamente distribuída no cérebro, estando em maior concentração em áreas relacionadas às emoções. Está relacionada à desordens de humor, à ansiedade, ao estresse, à neurotoxicidade, a náuseas e à nocicepção¹⁵. No sistema imunológico, a SP aparentemente apresenta um papel regulador da migração de células imunes ao regular a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão, além de participar na ativação de células da imunidade inata e adaptativa³⁶.

Uma coorte prospectiva em 6 unidades de terapia intensiva envolvendo 238 pacientes demonstrou uma maior concentração sérica de SP em sobreviventes à sepse em comparação com indivíduos que não sobreviveram ³⁷. Da mesma forma, um estudo semelhante com 310 pacientes mostrou que os níveis séricos de SP eram menores em não sobreviventes à sepse, de modo que este neuropeptídeo poderia ser um biomarcador de mortalidade nesta síndrome ³⁸.

A SP exerce seus efeitos na resposta inflamatória mediante a sua ligação com o receptor de neurocinina 1 (NK-1R). Um estudo evidenciou uma menor mortalidade, menores níveis séricos de citocinas inflamatórias IL-6, IL-1 β e MIP-2, maior contagem de neutrófilos em sangue e melhores parâmetros hemodinâmicos em murinos deficientes em NK-1R quando comparados a murinos selvagens ³⁹ (Figura 3).

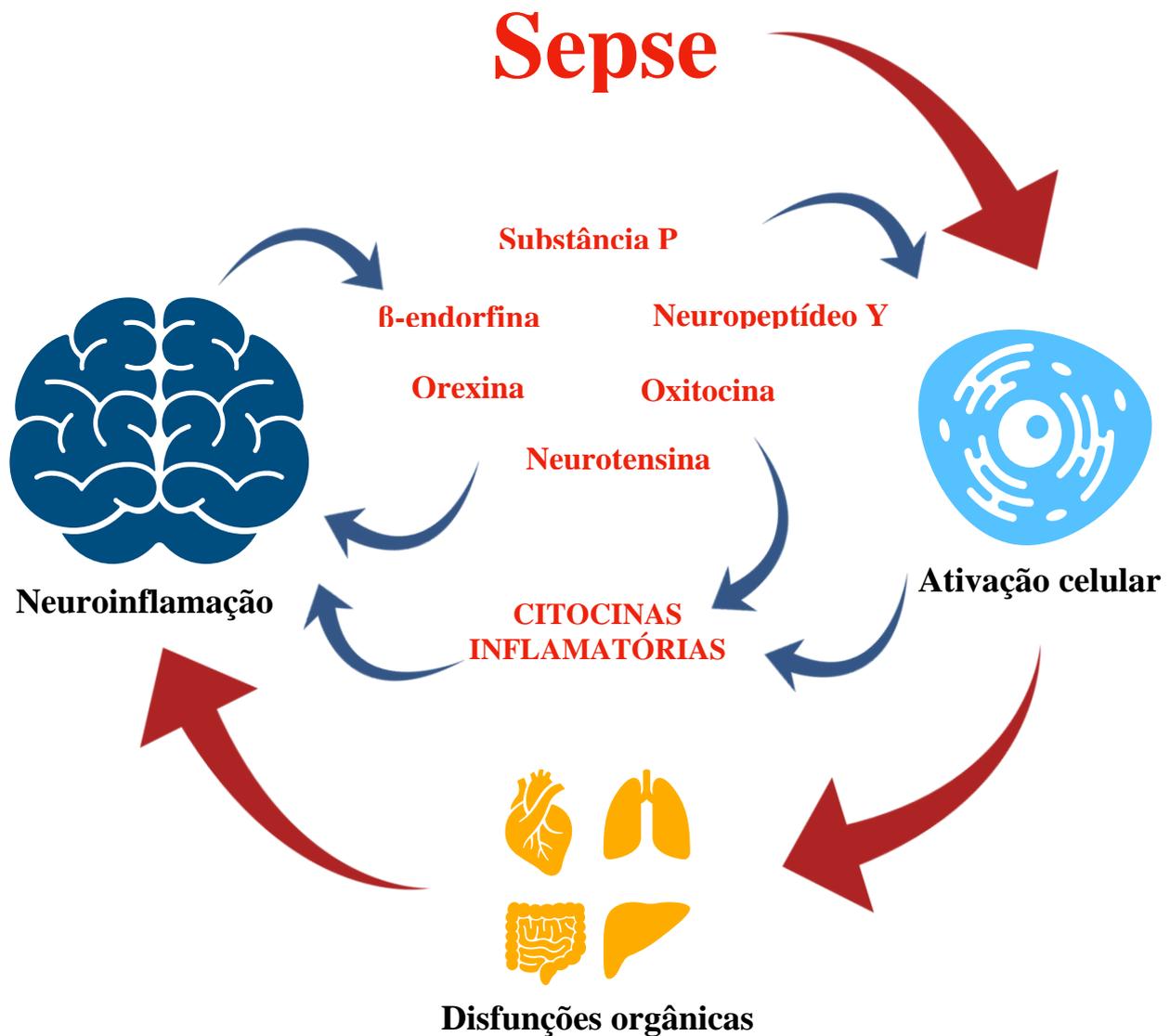


Figura 3 - Papel dos neuropeptídeos na sepsis

Os neuropeptídeos apresentam importantes funções na fisiopatologia da resposta imunoinflamatória, participando como reguladores da expressão e liberação de citocinas inflamatórias, e sendo importantes componentes na ativação de células imunes

O Fator Estimulante de α -Melanócitos (α -MSH) é um agonista de receptores de melanocortina 3 e 4, estando relacionado ao gasto energético, atividade física e supressão da ingestão alimentar ¹⁵. O α -MSH inibe múltiplas

formas de inflamação e está relacionada a melhora da lesão renal aguda induzida por sepse em modelos experimentais ⁴⁰.

Orexina A e B são peptídeos de 33 e 28 aminoácidos, respectivamente, que estão relacionadas à alimentação e à homeostase energética. São produzidas no hipotálamo posterior e os neurônios produtores de orexinas são não-gabaérgicos ¹⁵.

A Oxitocina é um peptídeo semelhante à vasopressina-arginina e é secretada por neurônios hipotalâmicos cujos axônios se estendem até a neurohipófise. Alguns estudos mostram que a oxitocina pode desestimular a resposta inflamatória em humanos, com expressivas implicações na fisiopatologia do choque séptico ¹⁵. Da mesma forma, um estudo em modelo experimental de sepse por injeção fecal intraperitoneal em ratos demonstrou uma menor concentração de citocinas inflamatórias plasmáticas nos animais tratados com oxitocina ⁴¹. Também em ratos, um estudo com modelo experimental de sepse por ligadura e punção cecal evidenciou variações na expressão e distribuição de oxitocina hipotalâmica, estando em menores níveis nos núcleos supraóptico e paraventricular e em maiores níveis em neurônios periventriculares e perivasculares ⁴².

A Neurotensina é um peptídeo de 13 aminoácidos produzido em grande quantidade no SNC e em células N do trato gastrointestinal, unindo-se com receptores NTS1 e NTS2. Seus receptores estão em altas concentrações em vias dopaminérgicas do SNC enquanto que, no trato gastrointestinal, está relacionado com a liberação de acetilcolina e serotonina, estimulando o peristaltismo gastrointestinal e apresentando um efeito trófico na mucosa

intestinal. Receptores de alta afinidade à neurotensina também foram encontrados em mastócitos e linfócitos, estimulando a liberação de histamina e a quimiotaxia, respectivamente. Em um modelo experimental de sepse foi encontrada uma redução da mortalidade em ratos tratados com antagonista farmacológico da neurotensina ¹⁵. Da mesma forma, um estudo comparativo em camundongos evidenciou maior mortalidade após a ligadura e punção cecal em animais selvagens quando comparados a camundongos deficientes em neurotensina e camundongos deficientes em receptores de neurotensina ⁴³.

A Melatonina é um neuropeptídeo produzido pela glândula pineal e por alguns outros tecidos como trato gastrointestinal, timo linfócitos CD4, CD8 e células B. Está relacionada com a regulação do sono e do humor. Nesse sentido, apresenta um potente efeito antioxidante ao unir-se com radicais livres, ajudando, desta forma, a combater microorganismos. Além de seus efeitos antioxidantes, é capaz de promover a liberação de IL-10, inibir o crescimento bacteriano, diminuir a expressão de óxido nítrico sintetase, diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias e inibir a mieloperoxidase, sendo um potencial alvo terapêutico na sepse. Em um modelo de endotoxemia com LPS em ratos, foi identificada uma redução na peroxidação lipídica, quimiotaxia e deformação de eritrócitos ¹⁵.

O Sistema Nociceptina consiste no neuropeptídeo Nociceptina/Orfanina FQ (N/OFQ) e seu receptor N/OFQ (NOP). O N/OFQ é um peptídeo de 17 aminoácidos semelhante aos opióides produzido e liberado por neurônios e outros tecidos periféricos a partir de um precursor de 30 aminoácidos, enquanto o receptor NOP está presente em grande quantidade no sistema nervoso central

e periférico. NOP e o precursor de N/OFQ são encontrados também em células relacionadas à resposta inflamatória como monócitos, linfócitos e polimorfonucleares, apresentando um efeito predominantemente pro-inflamatório, induzindo quimiotaxia e proliferação de células imunes. Um estudo experimental em ratos submetidos à ligadura e punção cecal (CLP) demonstrou que a administração parenteral de N/OFQ exacerbou a resposta inflamatória, levando a uma maior mortalidade nos animais submetidos ao modelo de sepse. Em humanos, uma pequena coorte de 21 adultos com sepse em terapia intensiva identificou uma maior concentração plasmática de N/OFQ entre os pacientes que evoluíram a óbito em comparação com os indivíduos que sobreviveram. Entre os principais mecanismos fisiopatológicos da sepse relacionados à N/OFQ estão a disfunção cardiovascular, mediante a supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, a vasodilatação periférica e o incremento da permeabilidade capilar ⁴⁴.

O Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) é um neuropeptídeo de 37 aminoácidos com um potente efeito vasodilatador. Um estudo em humanos demonstrou um incremento significativo no nível sérico de CGRP em pacientes com sepse, estando este aumento associado ao desenvolvimento de choque séptico. Em ratos submetidos a CLP, foi evidenciado um importante incremento nos níveis plasmáticos de CGRP 10 horas após a CLP, sendo o intestino o principal foco do aumento da expressão deste neuropeptídeo. Uma coorte prospectiva incluindo 61 pacientes com sepse após cirurgia abdominal de grande porte demonstrou um aumento significativo nos níveis séricos de CGRP nos não sobreviventes em relação aos pacientes que sobreviveram à sepse, desde o início do processo infeccioso ⁴⁵.

O Neuropeptídeo Y (NPY) é um peptídeo de 36 aminoácidos implicado em diversos processos fisiológicos do sistema nervoso central e periférico. Apresenta um potente efeito vasoconstritor ao potencializar a resposta adrenérgica, sendo um importante contrabalance na vasodilatação induzida pela sepse. Em ratos submetidos a modelo experimental de sepse mediante a administração de lipopolissacarídeo (LPS), a infusão de baixas doses de NPY associado à administração de noradrenalina incrementou a sobrevivência dos animais que receberam uma dose letal de LPS ⁴⁶.

As β -endorfinas são peptídeos que exercem diversas funções no organismo. No cérebro, atuam como neurotransmissores e neuromoduladores. São produzidas principalmente no lobo anterior da glândula pituitária e em células produtoras de pro-ópiomelanocortina no hipotálamo. As β -endorfinas aparentam ter um efeito inibitório na resposta imunológica. Algumas citocinas inflamatórias, como IL-2 e IFN- γ , têm uma liberação reduzida em resposta a β -endorfinas, enquanto que outras, como a IL-4, que apresenta características anti-inflamatórias, são liberadas em resposta a este neuropeptídeo ⁴⁷. Um estudo *in vitro*, no qual células linfóides de camundongos foram tratadas com β -endorfinas, demonstrou uma diminuição na produção de IL-1 β , IL-2, TNF- α , e IFN- γ ⁴⁸. Em modelo de endotoxemia em camundongos mediante a administração de LPS foi evidenciado um incremento na expressão de RNAm pro-ópiomelanocortina em tecidos periféricos e um aumento na expressão de β -endorfina em fígado e baço ⁴⁹.

Como já mencionado, os neuropeptídeos apresentam importantes efeitos no sistema imunológico, interferindo na resposta inflamatória e, inclusive, na lise

de bactérias. Uma coorte prospectiva em adultos internados em unidade de terapia intensiva avaliou o nível sérico de neuropeptídeos em pacientes admitidos na UTI, mostrando uma redução na concentração plasmática de neurotensina, substância P, oxitocina, α -MSH durante o choque séptico⁵⁰. Da mesma forma, um estudo do mesmo grupo demonstrou a redução nos níveis séricos e na expressão de genes de LL-37, uma catelicidina, em pacientes com choque séptico internados na unidade de cuidados críticos⁵¹. Portanto, ambas famílias de peptídeos, as catelicidinas e os neuropeptídeos, apresentam diversas funções, especialmente no sistema imunológico, sendo um componente importante nas diferentes vias da resposta inflamatória sistêmica ante uma infecção.

1.4 Catelicidinas e sepse

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas que apresentam um considerável papel na imunidade inata de mamíferos contra microorganismos. Até o momento, mais de 1200 tipos de AMPs de diversas origens foram identificados. Destes, 2 peptídeos antimicrobianos foram os mais extensivamente estudados em mamíferos, a saber: as defensinas e as catelicidinas⁵². Mais de 100 tipos de defensinas foram identificadas em mamíferos⁵³, das quais 6 α -defensinas e 3 β -defensinas foram descritas em humanos⁵⁴.

Somente 1 gene relacionado à produção de catelicidinas, denominado CAMP, foi encontrado em humanos e roedores que produz os peptídeos LL-37 e CRAMP, respectivamente⁵³. Estes peptídeos foram identificados, inicialmente,

em neutrófilos ⁵⁵, porém, posteriormente, foram encontrados em outras células e tecidos como monócitos, mastócitos, células NK, células B, medula óssea, trato respiratório, mucosa intestinal, mucosa do trato urinário, glândulas mamárias, epidídimo e pele ⁵³.

As catelicidinas apresentam diversos e complexos mecanismos de ação dentro da imunidade inata. Estes peptídeos levam à lise bacteriana mediante a união e desestabilização da membrana e da parede celular. Ressalte-se que apresentam capacidade de ligação com o lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias, levando a ativação de proteínas de membrana, indução de quimiotaxia e ativação de inflamossomas ⁵⁵. Outrossim, alteram a expressão gênica de células do hospede, levando a produção de quimiocinas, citocinas inflamatórias, promovem o recrutamento de leucócitos ao sítio da infecção, influenciam a diferenciação celular e modulam a resposta de células dendríticas e células T da resposta adaptativa. Assim, as catelicidinas agem como uma via de integração entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa ⁵².

Desta forma, o papel das catelicidinas na sepse é amplamente complexo, uma vez que age em diversas vias da resposta inflamatória e apresenta um comportamento variável ao longo da resposta inflamatória. Um estudo demonstrou um aumento no grau de expressão do gene LL-37 em humanos com sepse quando comparados com indivíduos do grupo controle e com indivíduos em choque séptico. Da mesma forma, o grau de expressão do gene LL-37 foi menor nos indivíduos em choque séptico quando comparados com indivíduos em uma fase de recuperação da sepse, mostrando uma variação da expressão da LL-37 ao longo da evolução desta síndrome inflamatória. Este mesmo estudo

demonstrou não haver uma diferença na concentração plasmática de LL-37 entre indivíduos saudáveis, doentes críticos sem sepse, pacientes sépticos, indivíduos com choque séptico e paciente em recuperação da sepse ⁵¹.

Em camundongos, foi evidenciada uma maior sobrevivência e um incremento da resposta imunológica em camundongos deficientes em CRAMP quando comparados com camundongos selvagens C57, de modo que os efeitos anti-inflamatórios parecem ser deletérios neste modelo experimental de sepse por CLP, sendo encontrado um estado de maior expressão dos genes relacionados à produção de interleucinas em camundongos deficientes em CRAMP ⁵⁵.

Devido à existência desta complexa interação entre as diferentes famílias de peptídeos com o sistema imunológico e a resposta inflamatória sistêmica, este estudo busca melhorar nossa compreensão sobre o efeito das catelicidinas na produção cerebral de neuropeptídeos em resposta à neuroinflamação ocasionada pela sepse, tanto na fase precoce como na fase tardia, em modelo experimental mediante ligadura e punção cecal em camundongos.

Objetivos



2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

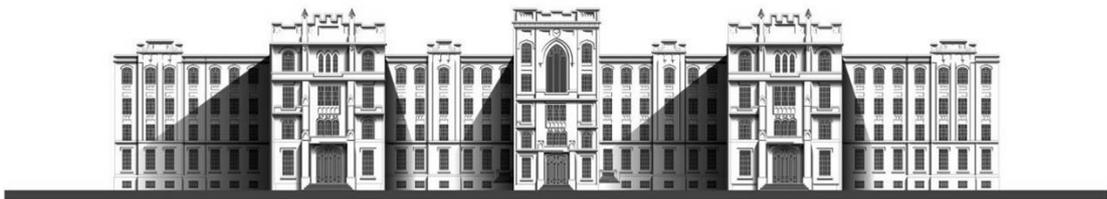
Analisar o efeito das catelicidinas na liberação cerebral de neuropeptídeos na inflamação tardia em modelo experimental de sepse por ligadura e punção cecal (CLP) em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

Identificar uma relação entre inflamação sistêmica e o efeito das catelicidinas na produção de neuropeptídeos no sistema nervoso central, na inflamação tardia, mediante:

- ✓ Dosagem de citocinas inflamatórias no plasma dos animais WT e CRAMP-KO, 24 horas e 15 dias após a CLP
- ✓ Dosagem de neuropeptídeos no córtex pré-frontal dos animais WT e CRAMP-KO, 24 horas e 15 dias após a CLP
- ✓ Dosagem de neuropeptídeos no hipocampo dos animais WT e CRAMP-KO, 24 horas e 15 dias após a CLP.

Materiais e Métodos



3. Materiais e métodos

3.1 Local de Experimentação

O estudo foi realizado no Laboratório de investigação da Disciplina de Emergências Clínicas (LIM-51) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo forneceu os animais, sendo eles mantidos em gaiolas no Biotério de Experimentação da Disciplina de Reumatologia - Departamento de Clínica Médica.

3.2 Aspectos éticos

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP aprovou o estudo sob o protocolo 1179/2018 (Anexos A e B). As orientações do guia PRESS foram seguidas (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences and National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C., 1996).

3.3 Animais de experimentação e grupos experimentais

Os animais utilizados no estudo foram os seguintes: 1) camundongos selvagens C57/BI6 machos de 8 semanas (Wild Type ou WT) e 2) camundongos machos deficientes em CRAMP (CRAMP-KO) de 8 semanas, ambos com peso médio de 20g. O uso de animais machos teve como objetivo diminuir a influência cíclica de hormônios sexuais na inflamação sistêmica.

O modelo de sepse foi realizado por ligadura e punção cecal. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas por 24 horas ou 15 dias com água e ração “*Ad libidum*” (Nuvilab CR1 - Nivutal Nutrientes, São Paulo, Brasil), períodos de claro/escuro e com temperatura ambiente controlada (21 a 23^o *Celsius*). Após 24 horas ou 15 dias, os animais foram eutanasiados e, então, coletados: plasma, hipocampo e córtex pré-frontal. As amostras foram mantidas em freezer a -80^o *Celsius* para posterior análise.

Para a análise do efeito das catelicidinas na resposta inflamatória nas fases precoce e tardia, o estudo foi realizado em 6 grupos: 1) animais CRAMP-KO submetidos a CLP e sacrificados em 24 horas (KO-24 horas); 2) animais CRAMP-KO submetidos a CLP e sacrificados em 15 dias (KO-15 dias); 3) animais CRAMP-KO não submetidos a CLP (KO-controle); 4) animais wild-type submetidos a CLP e sacrificados em 24 horas (WT- 24 horas); 5) animais wild-type submetidos a CLP e sacrificados em 15 dias (WT-15 dias); e 6) animais wild-type não submetidos a CLP (WT-controle).

3.4 Modelo de ligadura e punção cecal

O procedimento foi realizado sob anestesia intraperitoneal com Xilazina e Remifentanil. Posteriormente, os animais foram mantidos em posição anatômica, sendo realizada uma incisão transversal em pele e planos profundos no flanco esquerdo. Uma vez identificado o ceco, foi realizada ligadura cecal abaixo da inserção do íleo distal. Ligado o ceco, foram feitas 3 punções (proximal, medial e distal) no segmento cecal ligado com agulha 24G. Posteriormente, foi realizada a devolução do conteúdo visceral à cavidade abdominal e realizada a sutura do peritônio, do plano muscular e da pele. Os camundongos submetidos ao modelo de CLP foram identificados um a um e o horário do experimento de cada animal foi devidamente registrado.

3.5 Técnica de coleta de tecidos

Para a coleta de tecidos, a ordem e o horário da realização da CLP foram respeitados, de modo que a coleta de tecidos de cada animal foi realizada em horário próximo do experimento inicial, evitando, desta maneira, a interferência de fatores como o ciclo circadiano na produção de neuropeptídeos e variações na concentração de citocinas e neuropeptídeos decorrentes do tempo transcorrido entre o início da sepse e o momento da coleta.

A coleta dos tecidos analisados foi realizada após anestesia intraperitoneal com Xilazina e Remifentanil. Com o animal em posição anatômica, foi realizada incisão média ampla em parede abdominal, sendo identificada a veia cava inferior e, então, coletado sangue para posterior centrifugação e obtenção do plasma. Posteriormente, foi realizada a craniotomia e exérese do encéfalo para posterior identificação e coleta do córtex pré-frontal e hipocampo. Uma vez coletados, os tecidos foram armazenados em freezer a -80° *Celsius* para posterior análise (Figura 4).

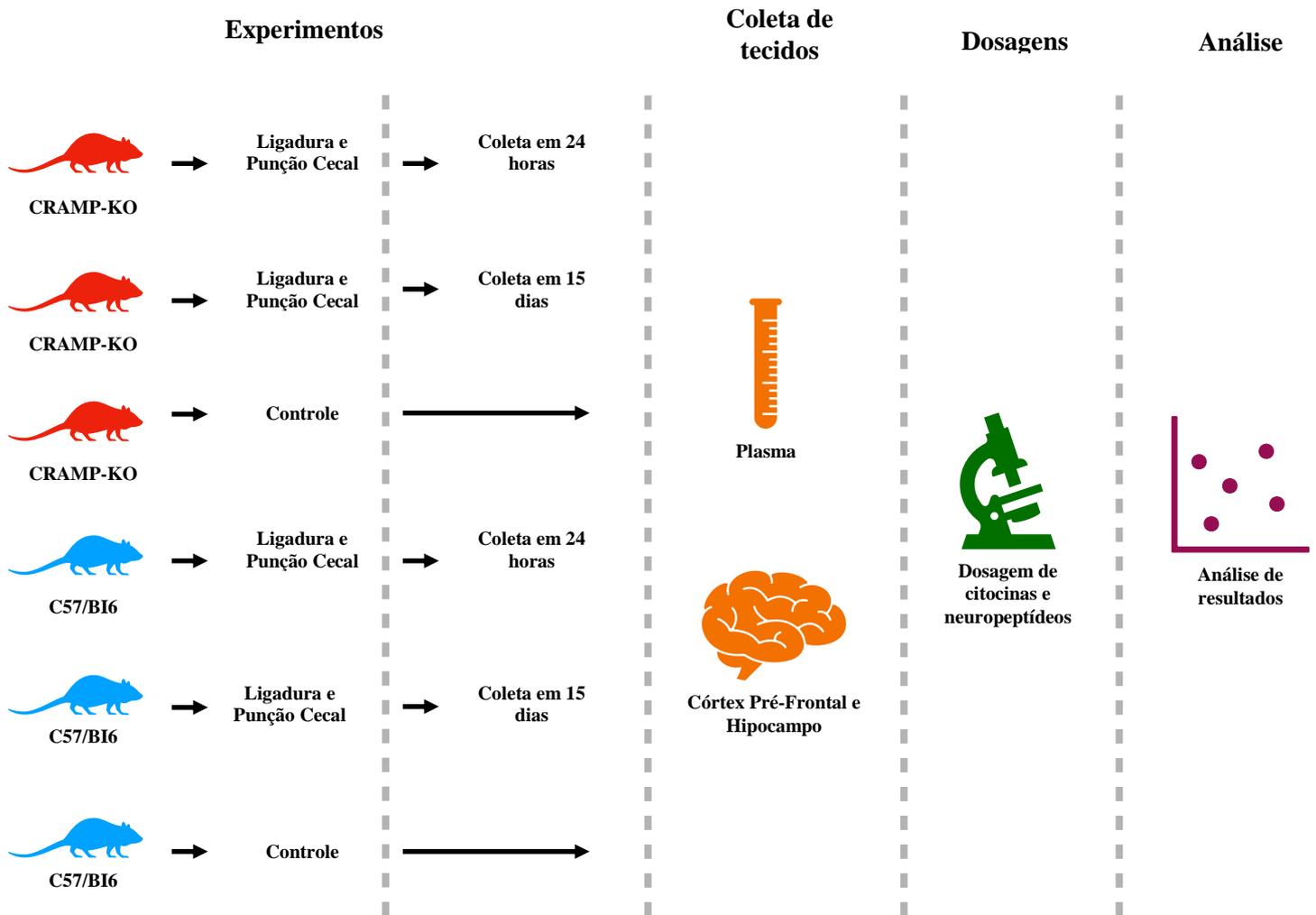


Figura 4 - Esquema do estudo e grupo de animais

A investigação foi realizada em 4 etapas, a saber: 1. Realização dos experimentos; 2. Coleta de tecidos (plasma, hipocampo e córtex pré-frontal); 3. Dosagem de citocinas inflamatórias no plasma e de neuropeptídeos no hipocampo e córtex pré-frontal; e 4. Análise de resultados. O estudo agrupou os animais da seguinte maneira: Grupo KO-Controle, Grupo KO-24 horas, Grupo KO-15 dias, Grupo WT-Controle, Grupo WT-24 horas e Grupo WT-15 dias.

3.6 Dosagem de neuropeptídeos e citocinas inflamatórias no material coletado

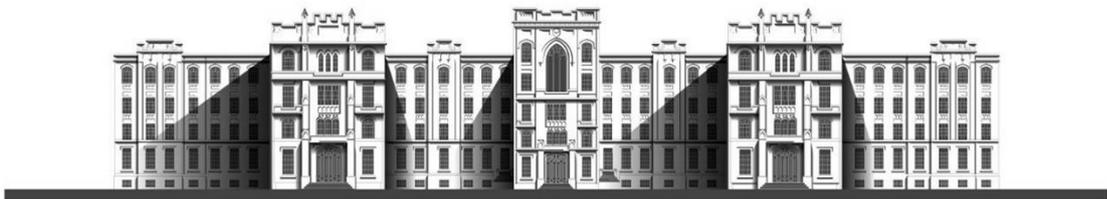
Posterior ao armazenamento do material coletado em freezer -80° Celsius, foram dosadas as seguintes citocinas inflamatórias no plasma: IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α . Os seguintes neuropeptídeos foram dosados no hipocampo e no córtex pré-frontal: neurotensina, β -endorfina, oxitocina e substância P. Todas as dosagens foram realizadas mediante a técnica Milliplex após o processamento de cada material. Os resultados das citocinas inflamatórias em plasma foram expressados em *pg/mL* e os resultados da

dosagem de neuropeptídeos nos tecidos cerebrais foram expressados em *pg/mL/mg* de tecido cerebral.

3.7 Análise estatística

Os 6 grupos de animais (combinação entre os tipos de animais e momento da coleta dos tecidos) foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, a análise pos-hoc mediante Mann-Whitney U Test com correção Bonferroni e os resultados apresentados graficamente em box-plot. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com $p \leq 0,05$. Os softwares R v4.1.1 e IBM SPSS Statistics v.28.0 foram utilizados para analisar os dados.

Resultados



4. Resultados

Foram incluídos 77 animais, sendo realizados 54 procedimentos de CLP, dos quais 29 foram realizados em camundongos CRAMP-KO e 25 em camundongos WT. Foram coletadas amostras de 23 camundongos controle, isto é, não submetidos a CLP, dos quais 12 eram camundongos CRAMP-KO e 11 camundongos WT.

Entre os camundongos CRAMP-KO, 12 foram submetidos a CLP e tiveram a coleta de tecidos realizada após 24 horas, sem nenhum óbito neste grupo, e 17 animais foram submetidos a CLP e tiveram seus tecidos coletados após 15 dias, dos quais 3 evoluíram a óbito antes de completar o tempo previsto (17,64%).

Entre os animais WT, 25 foram submetidos a CLP dos quais 11 tiveram seus tecidos coletados em 24 horas, sem nenhum óbito antes da coleta, e 14 pertenciam ao grupo de coleta de tecidos em 15 dias com 5 óbitos antes de completar o tempo previsto para coleta (35,71%).

Quando realizada a comparação da sobrevivência dos subgrupos de animais submetidos a CLP e que tiveram a coleta de tecidos realizada após 15 dias do insulto inicial, ou seja, os grupos WT-15 dias e KO-15 dias, não foi observada nenhuma diferença de sobrevivência entre eles (Log Rank Test: $p = 0,313$). (Figura 5).

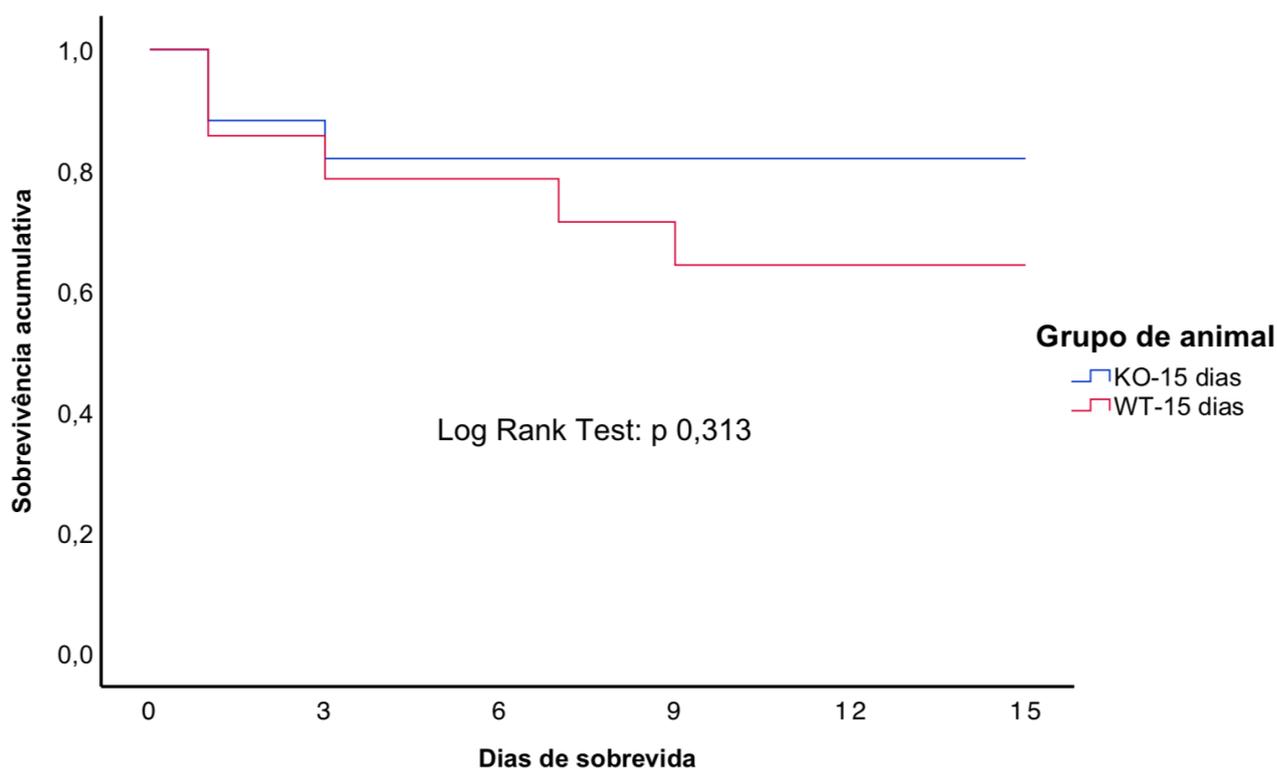


Figura 5 - Comparação de sobrevivência entre os animais dos grupos WT-15 dias e KO-15 dias. Apesar da tendência a maior sobrevivência no grupo CRAMP-KO em comparação aos animais WT após 15 dias da CLP, quando realizado a comparação mediante Log Rank Test esta diferença não foi observada ($p = 0,313$).

4.1 Citocinas inflamatórias em plasma

4.1.1 Interleucina-1 β

O grupo WT-24 horas apresentou maiores níveis de IL-1 β ao ser comparado aos grupos WT-Controle ($p = 0,02$) e WT-15 dias ($p < 0,01$).

Foram observados maiores níveis de IL-1 β no grupo KO-24 horas quando comparados ao grupo KO-Controle ($p < 0,01$), ao grupo WT-15 dias ($p < 0,01$) e ao grupo WT-Controle ($p < 0,01$).

O grupo WT-15 dias apresentou maiores níveis de IL-1 β quando comparado ao grupo KO-Controle ($p < 0,01$).

Outras comparações não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Figura 6).

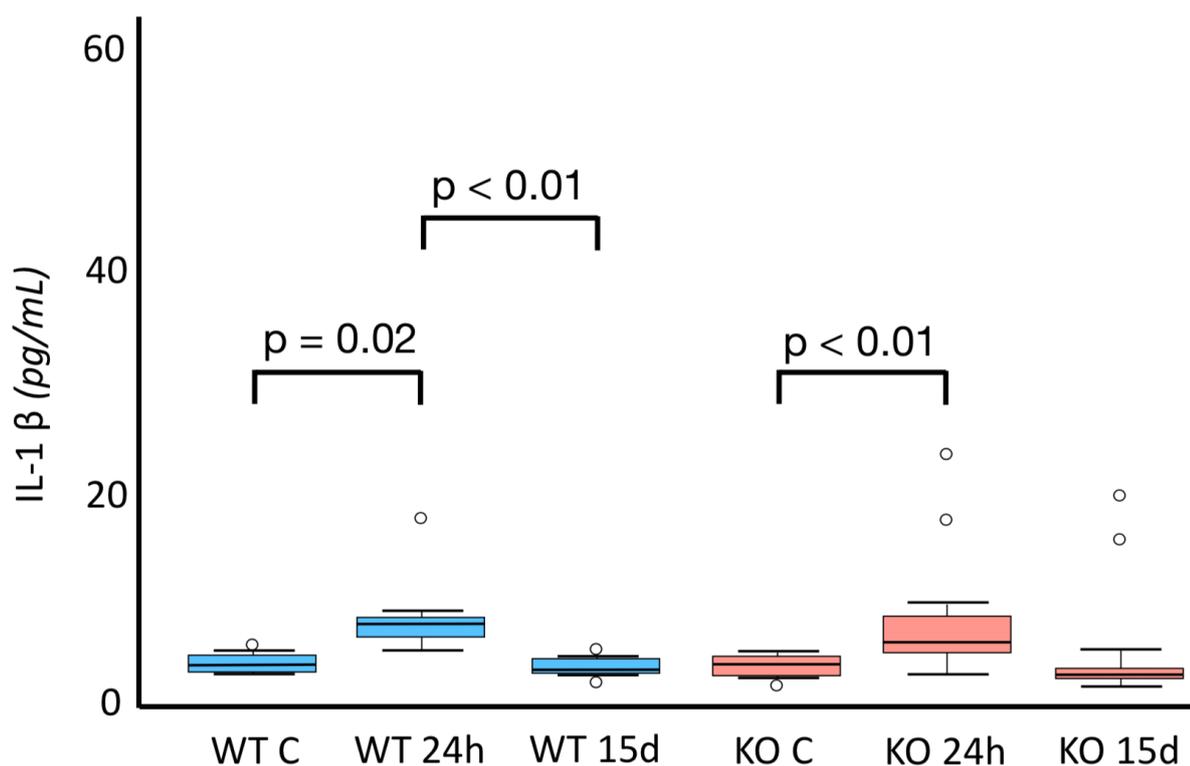


Figura 6 - Dosagem de IL-1 β em plasma

Maiores níveis de IL-1 β foram observados no Grupo KO-24 horas quando comparado com o Grupo KO-Controle ($p < 0.01$). O Grupo WT-24 horas apresentou maiores níveis de IL-1 β quando comparado aos grupos WT-15 dias ($p < 0.01$) e WT-Controle ($p = 0.02$). Os resultados são expressados em *pg/mL*.

4.1.2 Interleucina-6

Quando comparado a outros grupos, o grupo WT-24 horas apresentou maiores níveis de IL-6 em relação ao WT-15 dias ($p < 0,01$), WT-Controle ($p < 0,01$), KO-24 horas ($p = 0,03$), KO-15 dias ($p < 0,01$) e ao KO-Controle ($p < 0,01$).

O grupo KO-24 horas apresentou maiores valores de IL-6 quando comparados aos grupos KO-15 dias ($p < 0,01$), KO-Controle ($p < 0,01$), WT-15 dias ($p < 0,01$) e WT-Controle ($p < 0,01$).

O grupo WT-15 dias apresentou maiores níveis de IL-6 quando comparado ao grupo KO-Controle ($p < 0,01$).

O grupo KO-15 dias apresentou maiores níveis de IL-6 em relação aos grupos KO-Controle ($p < 0,01$) e WT-Controle ($p = 0,02$).

Outras comparações não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Figura 7).

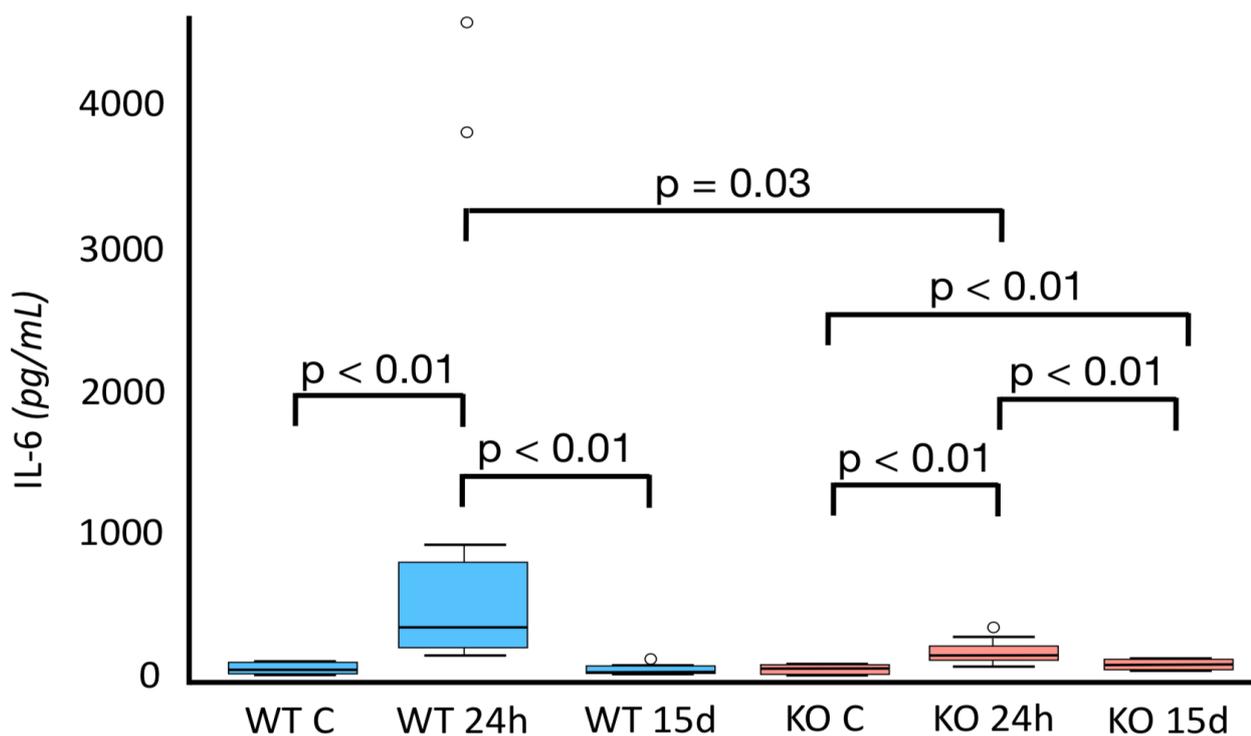


Figura 7 - Dosagem de IL-6 em plasma

Maiores níveis de IL-6 foram encontrados no plasma de animais do grupo WT-24 horas em comparação com os grupos KO-24 horas ($p = 0.03$), WT-15 dias ($p < 0.01$) e WT-Controle ($p < 0.01$). O grupo KO-24 horas apresentou maiores níveis de IL-6 quando comparados aos grupos KO-Controle ($p < 0.01$) e KO-15 dias ($p < 0.01$). O Grupo-KO 15 dias apresentou maiores valores em relação aos grupos KO-Controle ($p < 0.01$). Os resultados são expressados em pg/mL .

4.1.3 Interleucina-10

Maiores níveis de IL-10 foram observados nos animais dos grupos WT-24 horas em relação ao grupo WT-Controle ($p < 0,01$) e ao grupo KO-Controle ($p < 0,01$).

O grupo KO-24 horas apresentou maiores níveis de IL-10 quando comparados aos grupos KO-Controle ($p < 0,01$) e WT-Controle ($p < 0,01$).

O grupo KO 15-dias apresentou maiores níveis de IL-10 quando comparados aos grupos WT-Controle ($p = 0,02$) e KO-Controle ($p < 0,01$).

Outras comparações não mostraram diferenças (Figura 8).

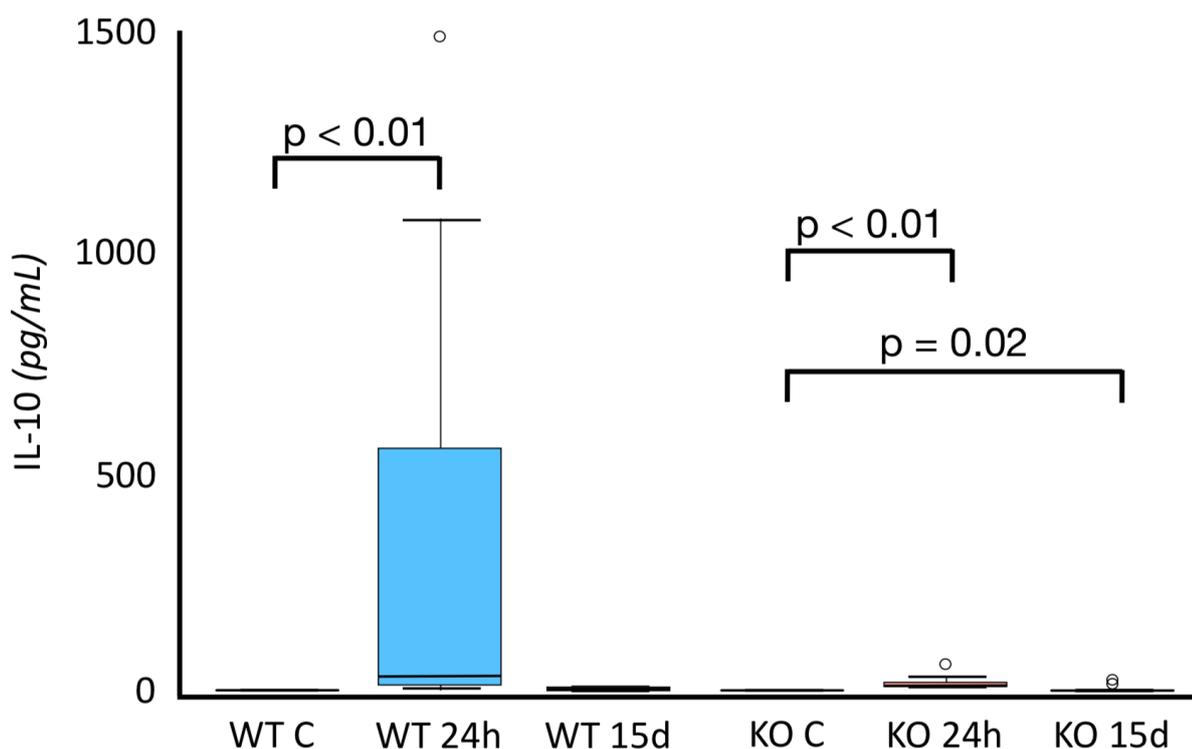


Figura 8 - Dosagem de IL-10 em plasma

Maiores níveis de IL-10 foram encontrados no plasma de animais do grupo WT-24 horas em relação ao grupo WT-Controle ($p < 0,01$). O Grupo KO-24 horas apresentou maiores níveis de IL-10 em comparação ao grupo KO-Controle ($p < 0,01$). O grupo KO-15 dias, quando comparado ao grupo KO-Controle, apresentou maiores níveis de IL-10 ($p = 0,02$). Os resultados são expressados em *pg/mL*.

4.1.4 Proteína Quimiotóxica de Monócitos -1

A MCP-1 esteve presente em maiores níveis no plasma dos animais do grupo WT-24 horas quando comparado com os grupos WT-15 dias ($p < 0,01$), WT-Controle ($p < 0,01$), KO-24 horas ($p = 0,01$), KO-15 dias ($p < 0,01$) e KO-Controle ($p < 0,01$).

O grupo KO-24 horas também apresentou maiores níveis de MCP-1 em relação aos grupos KO-15 dias ($p < 0,01$), KO-Controle ($p < 0,01$), WT-15 dias ($p < 0,01$) e WT-Controle ($p < 0,01$).

Outras comparações não apresentaram diferenças significativas (Figura 9).

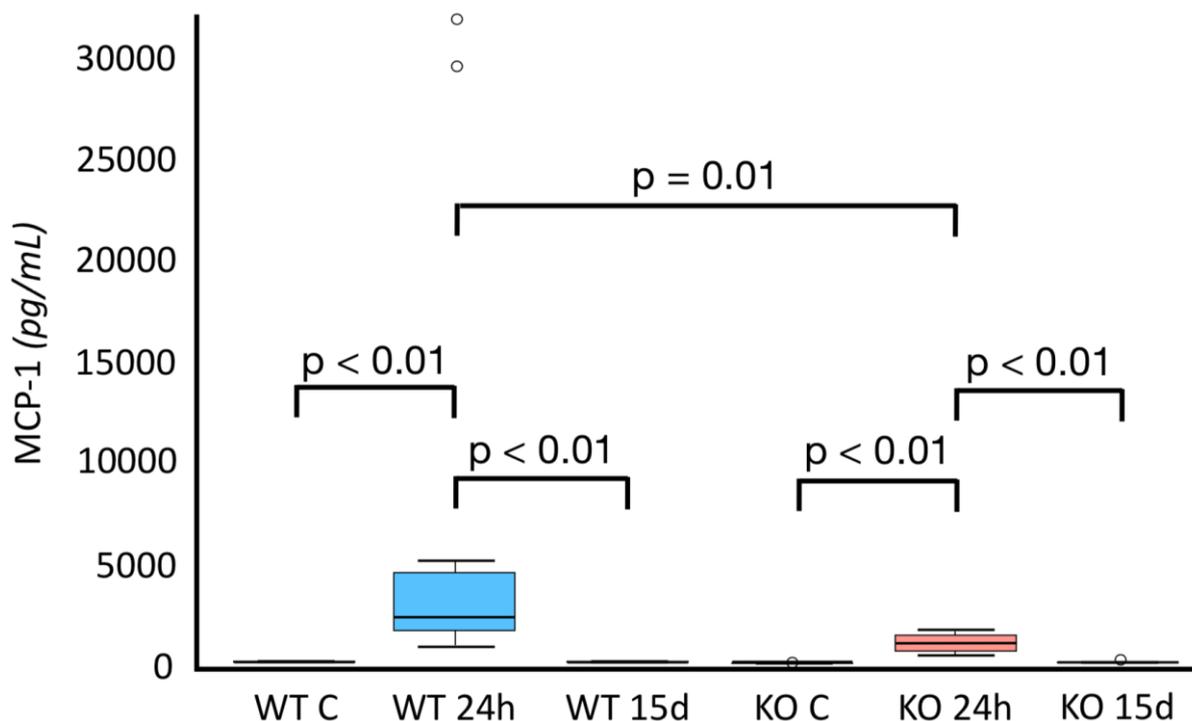


Figura 9 - Dosagem de MCP-1 em plasma

Maiores níveis de MCP-1 foram encontrados no plasma de animais do grupo WT-24 horas em comparação aos grupos WT-15 dias ($p < 0,01$), WT-Controle ($p < 0,01$) e KO-24 horas ($p = 0,01$). O grupo KO-24 horas, em comparação aos grupos KO-15 dias ($p < 0,01$) e KO-Controle ($p < 0,01$), também apresentou maiores níveis de MCP-1. Os resultados são expressados em *pg/mL*.

4.1.5 Fator de Necrose Tumoral - α

O grupo WT-24 horas apresentou maiores níveis de TNF- α do que o grupo WT-15 dias ($p < 0,01$), do que o grupo WT-Controle ($p < 0,01$), do que o grupo KO-15 dias ($p = 0,02$) e do que o grupo KO-Controle ($p < 0,01$).

Maiores níveis de TNF- α também foram encontrados nos animais do grupo KO-24 horas quando comparados aos grupos KO-15 dias ($p = 0,04$), KO-Controle ($p < 0,01$), WT-15 dias ($p < 0,01$) e WT-Controle ($p < 0,01$).

O grupo KO-15 dias apresentou maiores níveis de TNF- α ao ser comparado com o grupo WT-Controle ($p = 0,02$).

Outras comparações não tiveram diferenças estatisticamente significativas (Figura 10).

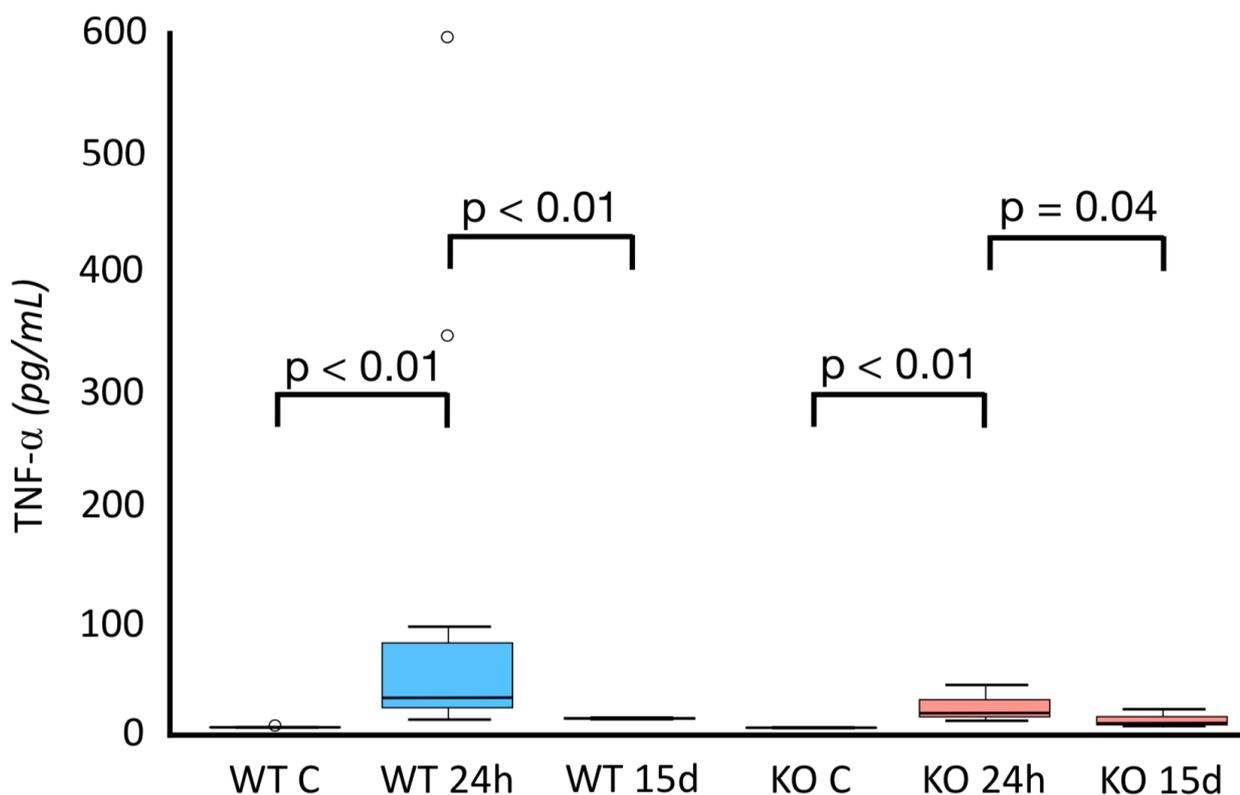


Figura 10 - Dosagem de TNF- α em plasma

Maiores níveis de TNF- α no plasma de animais do grupo WT-24 horas foram vistos em comparação aos grupos WT-15 dias ($p < 0.01$) e WT-Controle ($p < 0.01$). O grupo KO-24 horas apresentou maiores níveis de TNF- α em plasma em relação aos grupos KO-15 dias ($p = 0.04$) e KO-Controle ($p < 0.01$). Os resultados são expressados em *pg/mL*.

4.2 Neuropeptídeos em hipocampo

4.2.1 Neurotensina em hipocampo

O grupo WT-24 horas apresentou maiores níveis de neurotensina no hipocampo em relação aos grupos KO-24 horas ($p = 0,01$), KO-15 dias ($p < 0,01$) e KO-Controle ($p < 0,01$).

A Neurotensina também esteve presente em maiores níveis no hipocampo dos animais do grupo WT-Controle quando comparados ao grupo KO-Controle ($p = 0,03$) e ao grupo KO-15 dias ($p = 0,05$) (Figura 11).

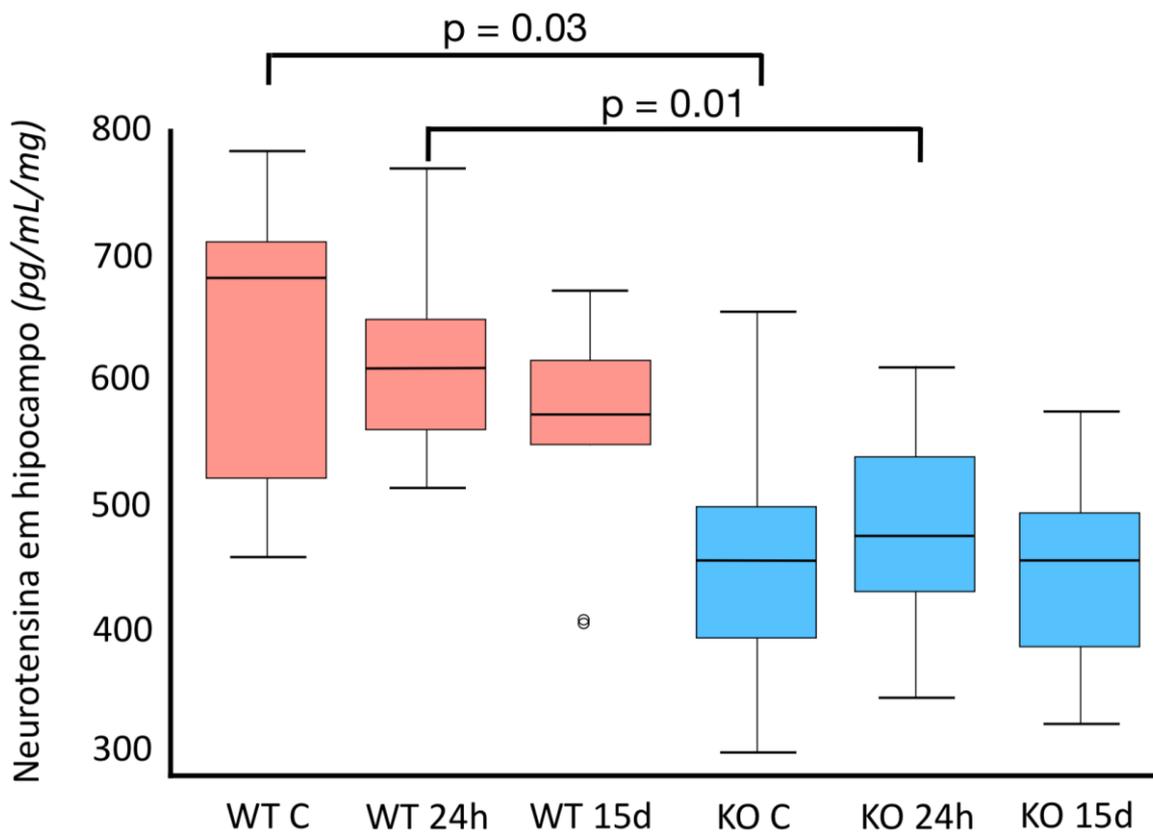


Figura 11 - Dosagem de neurotensina em hipocampo

Maiores níveis de neurotensina foram observados no hipocampo de animais do grupo WT-24 horas em comparação ao grupo KO-24 horas ($p = 0.01$). O hipocampo dos animais do grupo WT-Controle apresentou maiores níveis de neurotensina quando comparados ao grupo KO-Controle ($p = 0.03$). Os resultados são expressados em *pg/mL/mg*.

4.2.2 Oxitocina em hipocampo

Não houve nenhuma comparação aonde foi evidenciado alguma diferença estatisticamente significativa nos níveis de oxitocina no hipocampo dos diferentes grupos de animais ($p = 0.08$) (Figura 12).

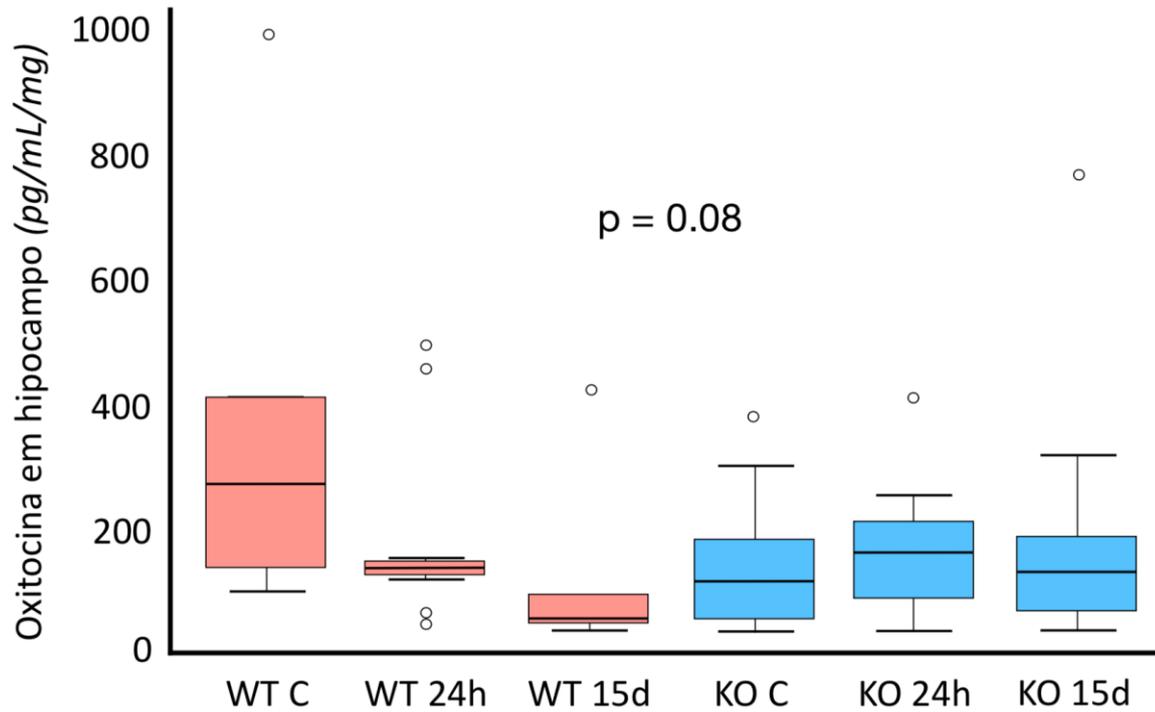


Figura 12 - Dosagem de oxitocina em hipocampo

Em nenhuma das comparações entre os grupos foi evidenciado alguma diferença estatisticamente significativa nos níveis de oxitocina no hipocampo dos animais ($p = 0.08$). Os resultados são expressados em pg/mL/mg .

4.2.3 β -endorfina em hipocampo

Em nenhuma comparação entre os níveis de β -endorfina no hipocampo dos diferentes grupos de animais houve alguma diferença estatisticamente significativa ($p = 0.20$) (Figura 13).

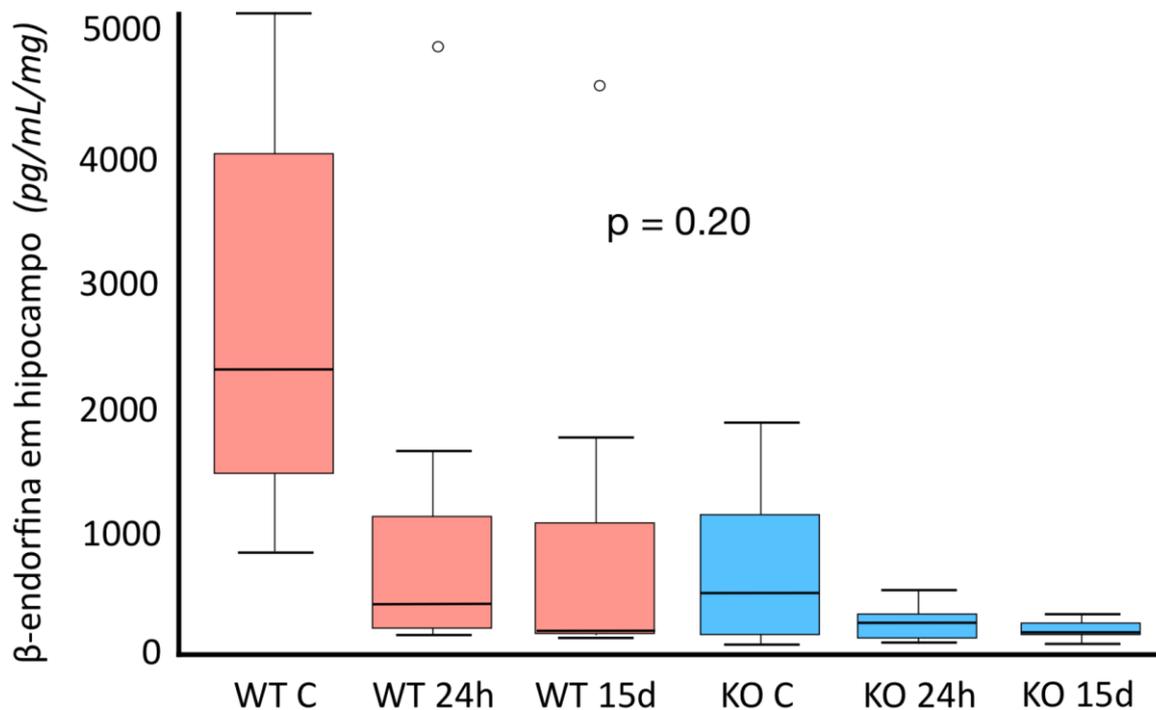


Figura 13 - Dosagem de β -endorfina em hipocampo

Em nenhuma das comparações entre os grupos foi evidenciado alguma diferença estatisticamente significativa nos níveis de β -endorfina no hipocampo dos animais ($p = 0.20$). Os resultados são expressados em $pg/mL/mg$.

4.2.4 Substância P em hipocampo

Os níveis de substância P no hipocampo foram maiores em animais do grupo WT-24 horas quando comparados aos grupos KO-Controle ($p < 0,01$) e KO-24 horas ($p = 0,05$).

Da mesma forma, animais do grupo WT-Controle apresentaram maiores níveis de substância P no hipocampo em comparação com animais do grupo KO-Controle ($p < 0,01$) (Figura 14).

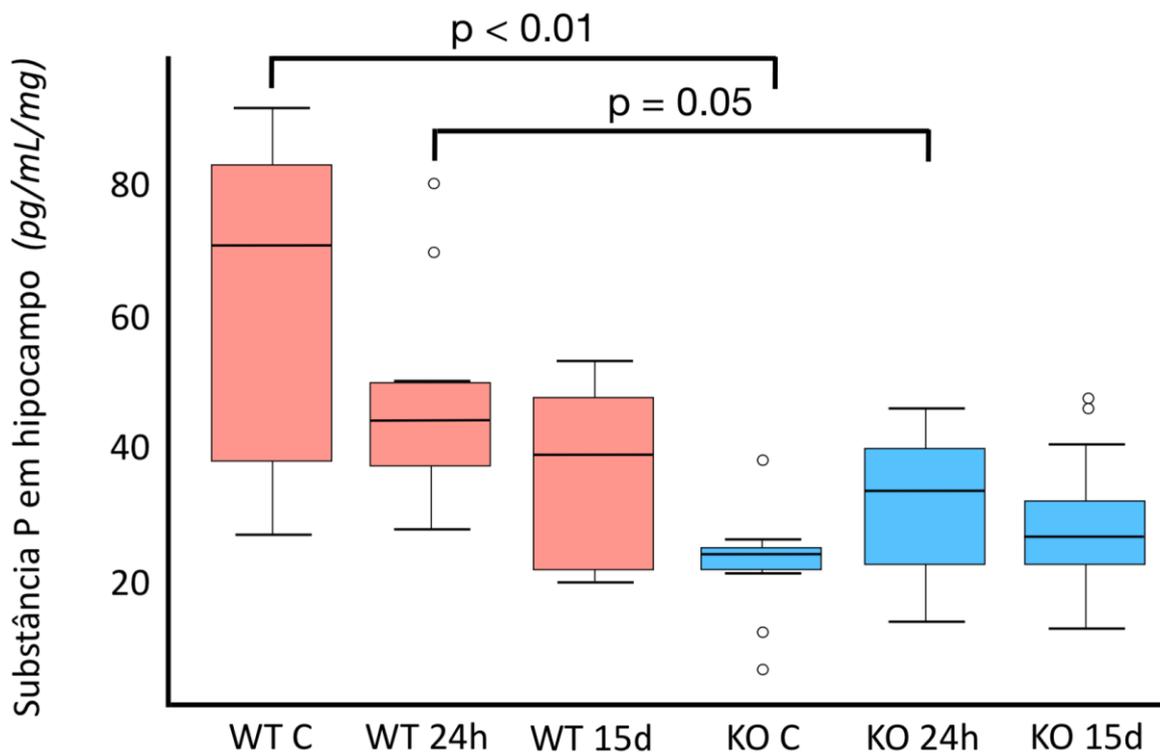


Figura 14 - Dosagem de Substância P em hipocampo

Maiores níveis de Substância P foram observados no hipocampo dos animais do grupo WT-24 horas em comparação ao grupo KO-24 horas ($p = 0.05$). O grupo WT-Controle apresentou maiores níveis de Substância P no hipocampo em relação ao grupo KO-Controle ($p < 0.01$). Os resultados são expressados em *pg/mL/mg*.

4.3 Neuropeptídeos em córtex pré-frontal

4.3.1 Neurotensina em córtex pré-frontal

A comparação entre os 6 grupos de camundongos mostrou-se ser diferente estatisticamente ($p = 0,02$), porém quando realizado a comparação por pares, entre os grupos, não houve diferença significativa (possivelmente devido ao número pequeno de animais em cada grupo e o alto número de comparações simultâneas) (Figura 15).

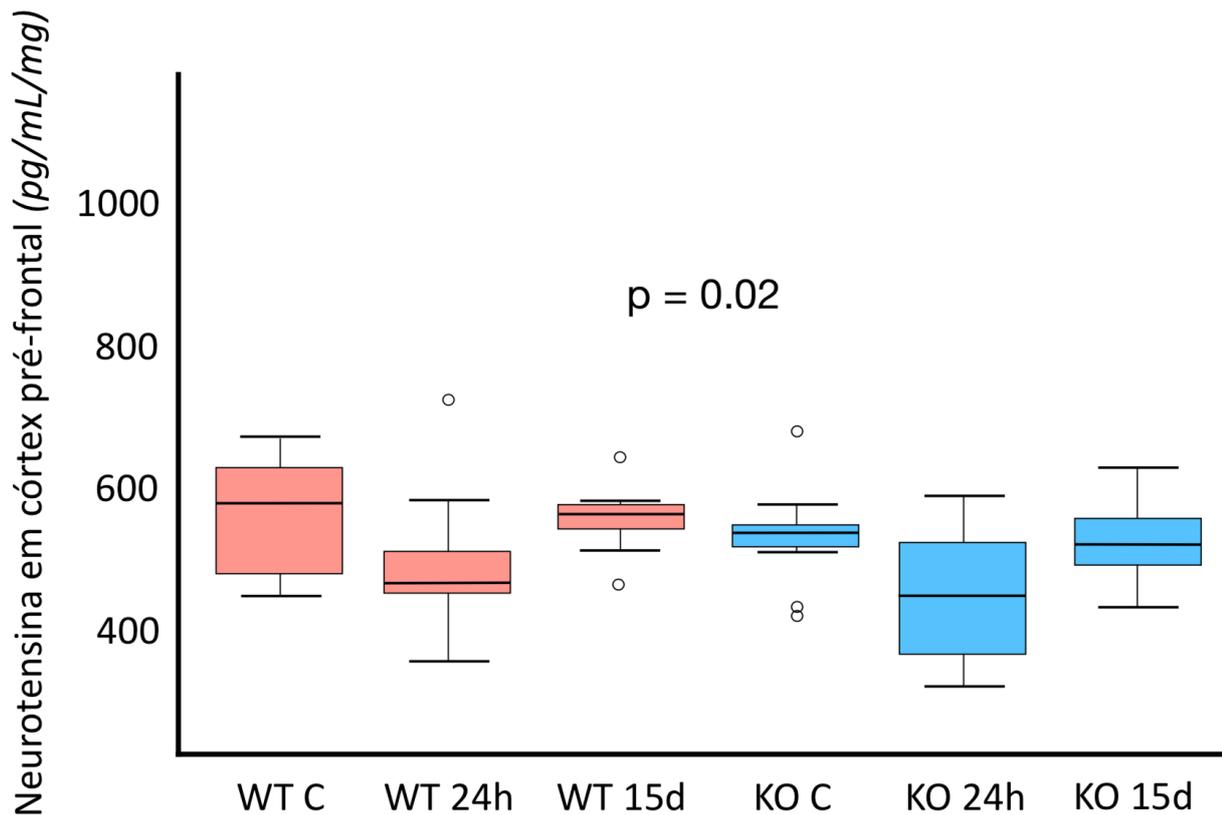


Figura 15 - Dosagem de neurotensina em córtex pré-frontal

Houve diferença estatisticamente significativa quando realizado a comparação entre os 6 grupos ($p = 0,02$), porém quando realizado a comparação por pares não foi encontrado nenhuma diferença significativa na dosagem de neurotensina no córtex pré-frontal dos diferentes grupos de animais. Os resultados são expressados em $pg/mL/mg$.

4.3.2 β -endorfina em córtex pré-frontal

Os níveis de β -endorfina no córtex pré-frontal dos diferentes grupos de animais não se mostraram diferentes estatisticamente ($p = 0,29$) (Figura16).

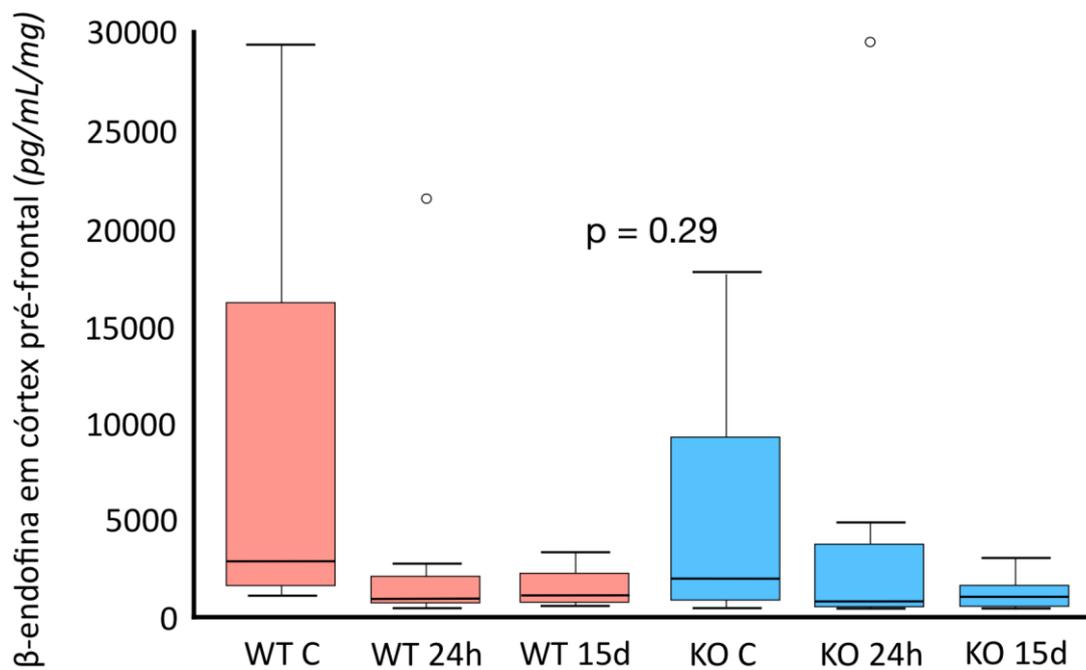


Figura 16 - Dosagem de β-endorfina em córtex pré-frontal

Em nenhuma das comparações entre os grupos foi evidenciado alguma diferença estatisticamente significativa nos níveis de β-endorfina no córtex pré-frontal dos animais ($p = 0.29$). Os resultados são expressados em $pg/mL/mg$.

4.3.3 Oxitocina em córtex pré-frontal

Quando comparados os 6 grupos de camundongos, houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0.01$), porém ao realizar as comparações simultâneas por pares não foi visto nenhuma diferença, possivelmente em decorrência do pequeno número de animais em cada grupo (Figura 17).

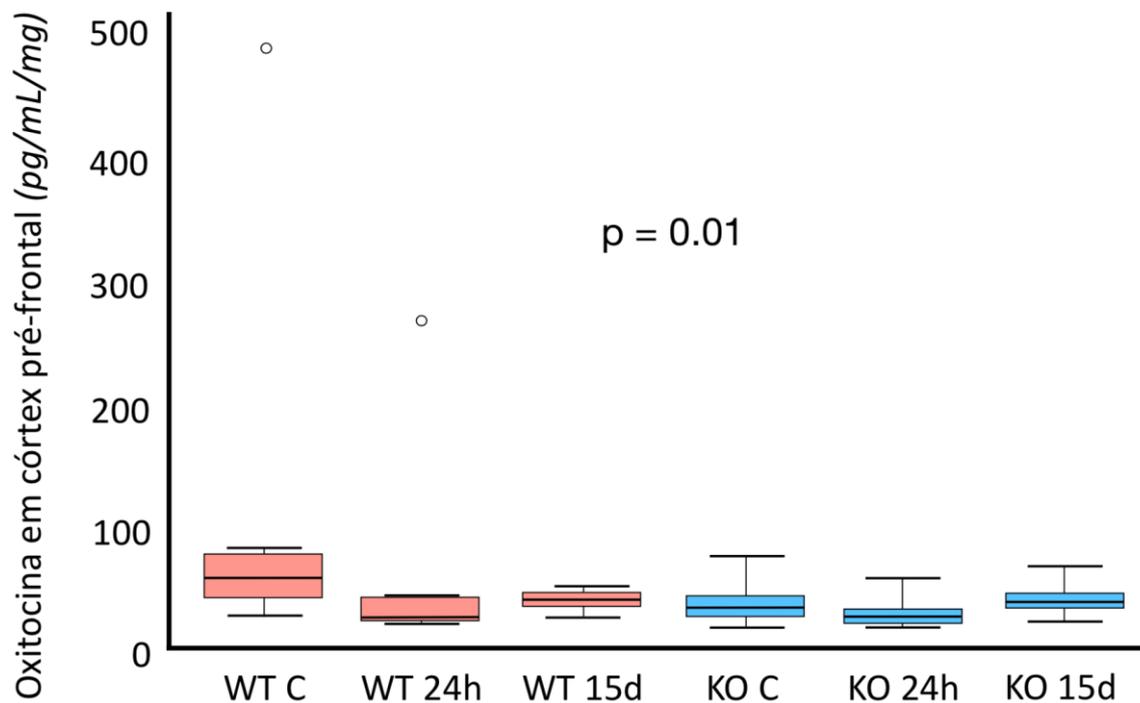


Figura 17 - Dosagem de oxitocina em córtex pré-frontal. Houve diferença estatisticamente significativa quando realizado a comparação entre os 6 grupos de animais ($p = 0.01$), porém quando realizado a comparação por pares, nenhuma diferença significativa foi evidenciada. Os resultados são expressados em *pg/mL/mg*.

4.3.4 Substância P em córtex pré-frontal

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de substância P no córtex pré-frontal dos diferentes grupos ($p = 0.51$) (Figura 18).

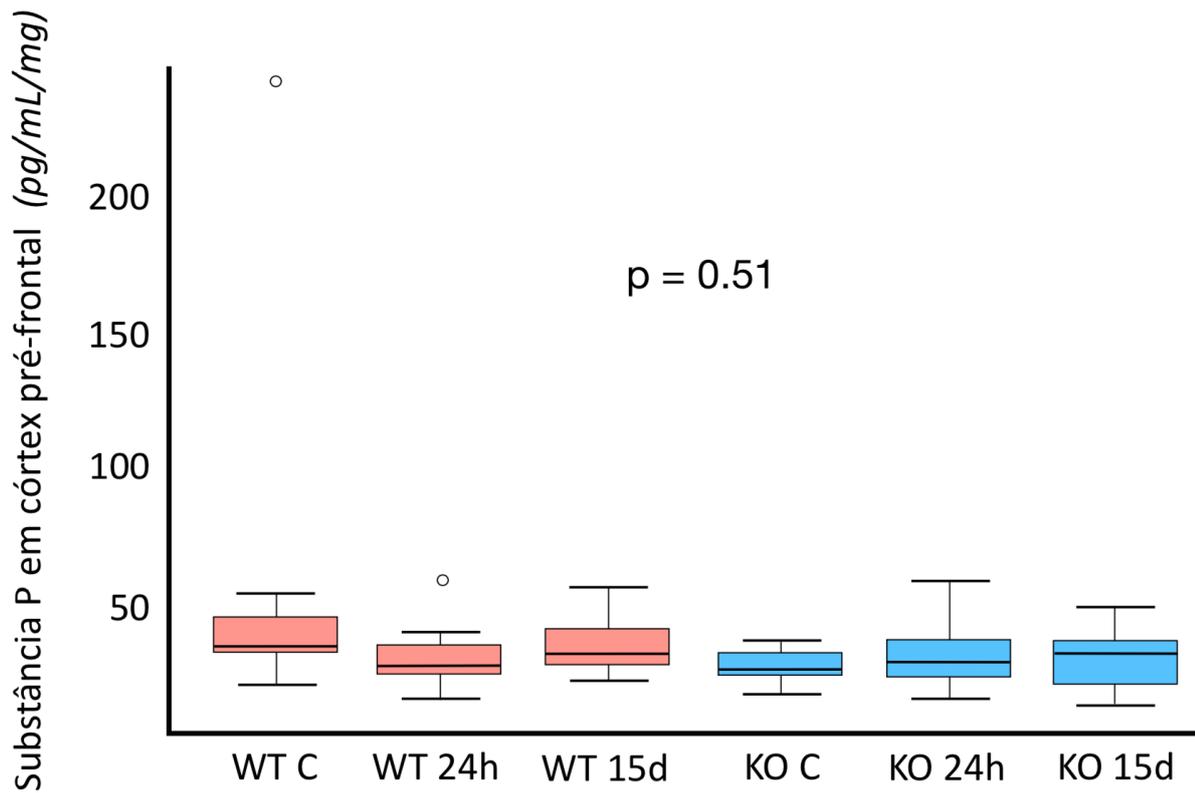
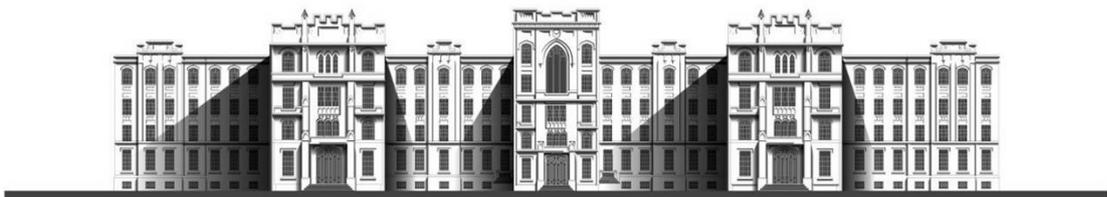


Figura 18 - Dosagem de substância P em córtex pré-frontal

Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa nos níveis de substância P no córtex pré-frontal dos diferentes grupos de animais ($p = 0,51$). Os resultados são expressados em *pg/mL/mg*.

Discussão



5. Discussão

Apesar de uma tendência a maior mortalidade aos 15 dias após a CLP nos camundongos selvagens C57/Bl6, este estudo não encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Provavelmente, este fato deveu-se ao número de animais em cada grupo, de modo que, se o número de animais incluídos fosse maior, uma diferença significativa de mortalidade entre camundongos WT e CRAMP-KO seria encontrada.

Estudos prévios demonstraram uma maior mortalidade em animais selvagens submetidos a CLP em comparação a animais deficientes em CRAMP. Esta diferença pode dever-se a um provável efeito deletéreo das catelicidinas na sepse nestes animais ⁵⁵. Essa diferença de mortalidade observada em estudos anteriores pode estar relacionada com uma resposta inflamatória sistêmica mais exacerbada nos animais selvagens como reflexo da maior liberação plasmática de citocinas inflamatórias, especialmente IL-6 e MCP-1, como observado na diferença de concentração dessas citocinas entre os animais do grupo WT-24 horas e os animais do grupo KO-24 horas no presente estudo, o que vai de encontro com trabalhos que mostram uma maior liberação de citocinas inflamatórias nas fases mais precoces da sepse ⁵⁶ e nos animais selvagens, isto é, que expressam a catelicidina CRAMP ⁵⁵.

A neurotensina aparenta ter um efeito prejudicial na sepse, como visto em estudos mostrando maior mortalidade em camundongos selvagens em relação a camundongos deficientes em neurotensina submetidos a modelo experimental de sepse mediante CLP ⁴³. Nosso estudo demonstrou maiores níveis de neurotensina no hipocampo dos animais

selvagens quando comparados aos animais deficientes em CRAMP, levando a hipótese de que as catelicidinas podem ser importantes mediadores na produção de neurotensina cerebral, e, portanto, o efeito sabidamente deletéreo da neurotensina na sepse, como visto em estudos em que foram demonstrados diversos efeitos no sistema cardiovascular, como hipotensão, vasodilatação e incremento da permeabilidade capilar ⁵⁷, pode ser potencializado pelo efeito das catelicidinas. Nesse sentido, é possível que os maiores níveis de IL-6 e MCP-1 nos animais do grupo WT-24 horas em comparação aos animais do grupo KO-24 horas estejam relacionados com a diferença observada na concentração de neurotensina no hipocampo desses animais.

É importante mencionar que, apesar de a neurotensina apresentar um importante papel na regulação de neurônios corticais pré-frontais, especialmente em vias GABAérgicas ⁵⁸, não houve diferença significativa na concentração de neurotensina no córtex pré-frontal entre os grupos estudados. É possível que o córtex pré-frontal não sofra uma interferência direta na produção de neurotensina em resposta às catelicidinas ou não seja uma estrutura cerebral alvo na sepse em camundongos.

Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de β -endorfina em ambos os tecidos cerebrais analisados neste estudo. Um aumento na expressão de β -endorfinas em tecidos periféricos, como fígado e baço, foi observado em modelo de endotoxemia mediante administração de LPS em camundongos ⁴⁹, tal achado pode justificar o fato de não haver sido encontrada diferença nos níveis de β -endorfina nos tecidos cerebrais dos diferentes grupos de animais estudados nesta investigação, mostrando um possível aumento na liberação sistêmica deste neuropeptídeo sem estar associado ao incremento em sua concentração no SNC. Provavelmente, o papel da β -endorfina na fisiopatologia da sepse seja predominantemente periférico, como observado

em um estudo que demonstrou a importância deste neuropeptídeo na ativação do eixo hipófise-adrenal em modelo experimental de sepse tratado com naloxona ⁵⁹.

Apesar de estudos mostrarem um aumento nos níveis plasmáticos de oxitocina em resposta à sepse ⁶⁰, e uma menor concentração deste neuropeptídeo em camundongos sobreviventes à sepse ⁶¹, o presente estudo não encontrou uma diferença significativa na concentração de oxitocina no hipocampo e no córtex pré-frontal dos animais WT e CRAMP-KO. Foi demonstrado que existe uma migração na taxa de maior transcrição de oxitocina entre os diferentes tecidos cerebrais em animais submetidos a modelo experimental de sepse, seja por CLP ou administração de LPS, o que pode, em parte, justificar o fato de não ter sido encontrada diferença na concentração de oxitocina nos tecidos cerebrais dos animais estudados ⁴². Por ser um hormônio com diversos efeitos sistêmicos, é provável que o aumento dos níveis plasmáticos de oxitocina em animais submetidos a modelo experimental de sepse não se reflita necessariamente em um incremento na concentração desta substância nos tecidos cerebrais de camundongos.

Encontramos maiores níveis de substância P no hipocampo dos animais selvagens em comparação com animais deficientes em CRAMP. Tal achado pode estar relacionado com o fato de os animais selvagens apresentarem maior circulação de citocinas inflamatórias, maior resposta inflamatória e, conseqüentemente, maior mortalidade. Um estudo mostrou que a deficiência de NK-1R (receptor da substância P), está associada a menor mortalidade em modelo experimental de sepse ³⁹. Este achado pode justificar-se pelo efeito regulatório que as citocinas exercem sobre a maior expressão de NK-1R, potencializando o efeito da substância P na resposta inflamatória ³⁶.

De modo semelhante, em um modelo experimental de sepse mediante a administração de LPS em camundongos deficientes em gene da pre-protaquinina A (PPT-A), que tem como principais produtos a substância P e a neurocinina-A, e camundongos

selvagens, a indução da resposta inflamatória sistêmica determinou maiores níveis de substância P em plasma, fígado, rins e pulmões, e maiores níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-6 em animais do grupo WT, quando comparados a camundongos deficientes em gene da PPT-A. Esta observação reforça a hipótese do efeito deletéreo da substância P na sepse⁶². Assim, as catelicidinas podem ser importantes reguladores da produção de substância P no hipocampo destes animais submetidos ao modelo de sepse.

A maior concentração de substância P no hipocampo dos animais WT-24 horas em relação aos animais KO-24 horas pode ser influenciada pela maior concentração de IL-6 e MCP-1 observada nos animais do grupo wild-type que tiveram a coleta de tecidos realizada 24 horas após a sepse em comparação aos animais CRAMP-KO submetidos a CLP e que tiveram a coleta de tecidos realizada no mesmo tempo.

A substância P exerce um significativo papel na imunomodulação dentro do sistema nervoso central, além de regular a resposta e recrutamento de células gliais em situações inflamatórias agudas, alterar a permeabilidade da barreira hematoencefálica e de estar envolvido na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas como na doença de Parkinson, esclerose múltipla e encefalite autoimune³⁶. Foi evidenciada uma maior concentração de algumas citocinas inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, tanto em 60 como em 90 dias após a sepse, além de um persistente aumento nos níveis de proteína β -amilóide no córtex pré-frontal de ratos submetidos a CLP⁶³. Entretanto, nosso estudo não observou diferença significativa entre os níveis de substância P no córtex pré-frontal dos diferentes grupos de animais. Possivelmente, este tecido cerebral não tenha a mesma propriedade de outros tecidos, como o hipocampo, no acúmulo de substância P em resposta à sepse.

Embora outros neuropeptídeos possam apresentar diferenças entre os grupos em suas dosagens nos tecidos cerebrais, este estudo somente avaliou os níveis de neurotensina, β -endorfina, oxitocina e substância P devido ao fato de estarem entre os mais

estudados em sepse, em distúrbios neuropsiquiátricos e representarem potenciais alvos terapêuticos^{47 36 58}.

Este estudo reforça a importância das catelicidinas e dos neuropeptídeos como elementos fundamentais na resposta inflamatória sistêmica, embora o mecanismo mediante o qual estas moléculas participam e interagem entre si parece ser extremamente complexo, e provavelmente se comportem com importantes diferenças entre as espécies de animais.

É importante ressaltar que, apesar de o CRAMP apresentar um efeito deletéreo na sepse em camundongos, a relação entre catelicidinas e a gravidade da resposta inflamatória parece não se repetir em outros mamíferos, como em seres humanos, nos quais esta relação parece ser mais complexa, com efeitos pró e anti-inflamatórios, já que foi visto que, apesar de humanos com sepse apresentarem uma maior expressão gênica da catelicidina LL-37, este fato não se refletiu em uma maior concentração plasmática de LL-37⁵¹.

Entre os pontos mais importantes deste trabalho, vale ressaltar que para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia a influência das catelicidinas na concentração de neuropeptídeos no parênquima cerebral de animais submetidos a modelo experimental de sepse em uma etapa mais tardia da resposta inflamatória sistêmica.

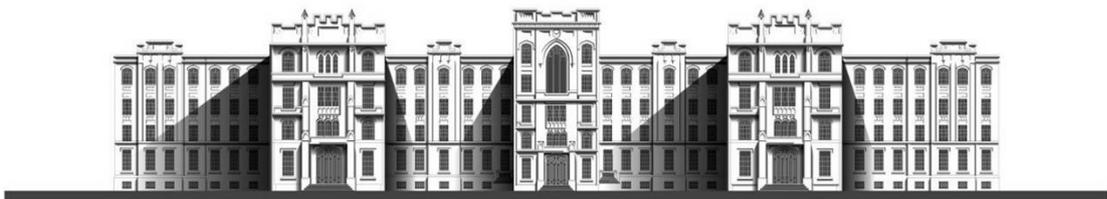
Este estudo não avaliou a concentração de citocinas inflamatórias no hipocampo e no córtex pré-frontal, e nem a concentração de neuropeptídeos em plasma. Devido as características físicas dos animais estudados, o volume de plasma obtido para análise das citocinas inflamatórias, ao redor de 0,7 mL, não permitiu realizar dosagens adicionais. Da mesma forma, devido as pequenas dimensões do hipocampo e do córtex pré-frontal dos animais utilizados neste estudo, não foi possível determinar a concentração de outras substâncias nestes tecidos cerebrais. Tanto a dosagem de citocinas inflamatórias nos

tecidos cerebrais, como a dosagem de neuropeptídeos no plasma, permitiriam obter mais dados e assim estabelecer uma relação entre a concentração de neuropeptídeos e de citocinas inflamatórias nos tecidos estudados.

Outro importante fator limitante para o estudo foi o fato de a inclusão de animais nos diferentes grupos ter sido afetada pela pandemia COVID-19. Durante os picos de maior número de casos da doença, em respeito as políticas de combate a disseminação do SARS-CoV2, houve restrições no acesso aos laboratórios da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo além de uma redução na criação dos animais no Centro de Bioterismo da FM-USP.

Cabe ressaltar a dificuldade existente na realização de estudos experimentais. Durante a realização deste trabalho, houve diversos obstáculos como a obtenção de animais para treinamento e realização dos experimentos, o aprendizado da técnica cirúrgica, a padronização do modelo experimental de sepse, familiarização com os métodos estatísticos e principalmente a conciliação do tempo dedicado às atividades laborais com o tempo dedicado à pesquisa em uma situação de emergência sanitária global.

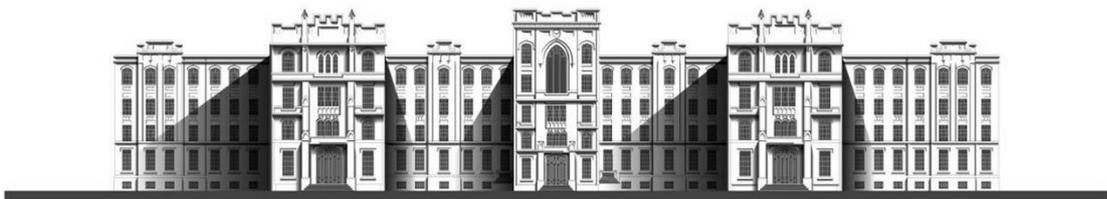
Conclusões



6. Conclusões

Os nossos achados sugerem que as catelicidinas exacerbam a resposta inflamatória, ocasionando elevação nos níveis plasmáticos de algumas citocinas inflamatórias, especialmente nas etapas mais precoces da sepse, e nos níveis de neurotensina e substância P no hipocampo, porém este aumento na concentração destes neuropeptídeos não foi observado no córtex pré-frontal.

Anexos



7. Anexos

Anexo A - Aprovação na comissão de ética para o uso de animais



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Análise da resposta inflamatória tardia em camundongos deficientes em CRAMP submetidos a modelo experimental de sepse**”, registrada com o nº **1179/2018**, sob a responsabilidade de **Fabiano Pinheiro da Silva** e **Ismael Perez Flores**, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 28.11.18.

| Finalidade | () Ensino (x) Pesquisa Científica |
|-------------------------|---|
| Vigência da autorização | Início: 19-01-2019 Término: 15-05-2022 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongo C57BI e deficientes em CRAMP |
| Nº de animais | 42 |
| Peso/Idade | 7 semanas |
| Sexo | machos |
| Origem | Biotério FMUSP |

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 28 de Novembro de 2018

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo B - Aprovação na comissão de ética para o uso de animais

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

| | |
|--|--|
| PROTOCOLO DE PESQUISA Nº: 1179/2018 | Data de entrada: 22-10-2018 Data sessão: 07-11-2018 |
|--|--|

TÍTULO: Análise da resposta inflamatória tardia em camundongos deficientes em CRAMP submetidos a modelo experimental de sepse.

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Fabiano Pinheiro da Silva

PESQUISADOR EXECUTANTE: Ismael Perez Flores

DEPARTAMENTO: Clínica Médica

CONSIDERAÇÕES DO RELATOR APROVADAS PELO PLENÁRIO:

O estudo investigará a resposta inflamatória em camundongos selvagens e deficientes em CRAMP (*Cathelicidin Related Antimicrobial Peptide*) submetidos à sepse. Para indução de sepse será utilizado o modelo de ligadura cecal. Os camundongos serão anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina (75 mg/kg de peso do animal) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg de peso do animal). No período pós-operatório, os animais serão tratados com carprofeno 10 mg/kg (SC) para minimizar a dor. Após a cirurgia, os animais permanecerão em gaiolas metabólicas por 24 h com água e ração *ad libidum*. Após 15 dias, os animais serão submetidos à eutanásia e coleta de pulmões, rins, plasma, cérebro e íleo terminal para análise de resposta imuno-inflamatória. A eutanásia será realizada mediante sobredose de cloridrato de cetamina (180mg/kg de peso corporal) e cloridrato de xilazina (20mg/kg de peso corporal) por via intraperitoneal.

Como procedimento analgésico, inicialmente, o pesquisador informa no formulário CEUA que utilizará carprofeno e, posteriormente, relata o uso de cloridrato de tramadol. A CEUA-FMUSP sugere que, para o procedimento anestésico, seja utilizado cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina, conforme descrito pelo pesquisador, em associação à acepromazina (1 mg/kg de peso corporal; subcutâneo). Como protocolo de analgesia, recomenda-se a utilização de metadona a cada 8 h, durante 10 dias. O pesquisador solicita um total de 60 camundongos, sendo 20 com o objetivo de treinamento da técnica cirúrgica pelo aluno. Entretanto, mediante ao atendimento das sugestões supracitadas da CEUA-FMUSP, haverá aprovação de 42 camundongos, sendo 2 para treinamento da técnica cirúrgica.

Total de animais: 42

Espécie: camundongo

Linhagem: SPF - C57BI/6 e deficientes em CRAMP

Sexo: macho

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
CEUA - FMUSP

CONCLUSÃO: Devolvido

Referências



8. Referências

1. Singer M, Deutschman C S, Seymour C W, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315 (8): 801-1.
2. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari N K J, et al. International Forum of Acute Care Trialists. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis: current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016; 193(3): 259–272.
3. Taniguchi L U, Bierrenbach A L, Toscano C M, Schettino G P P and Azevedo C P L. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. *Critical Care*. 2014; 18: 608.
4. Prescott H C; Angus D C, et al. Enhancing Recovery From Sepsis: A Review. *JAMA*. 2018; 319: 62-75.
5. Rudd K E, Johnson S C, Machado F R, Angus D C, Naghavi M et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990 - 2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020; 395: 200-211.
6. Kaukonen K M, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R et al. Mortality related to Severe Sepsis and Septic Shock among Critically Ill Patients in Australia and New Zealand, 2000 - 2012. *JAMA*. 2014; 311: 1301-1310.
7. Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley E, Jimenez E, Mohan A, Khan R A, Whittle J, Jacobs E and Nanchal R. Nationwide Trends of Severe Sepsis in the 21st Century (2000-2007). *CHEST*. 2011; 140: 1223–1231.
8. Machado F R, Ferreira E M, Azevedo C P L for Latin American Sepsis Institute Network. Quality Improvement Initiatives in Sepsis in an Emerging Country: Does the Institution's Main Source of Income Influence the Results? An Analysis of 21,103 Patients. *Crit Care Med*. 2017; 45: 1650-1659.

9. Mostel Z, Perl A, Marck M, Mehdi S F, Lowell B, Bathija S, Santosh R, Pavlov V A, Chavan S S and Roth J. Post-sepsis syndrome – an evolving entity that afflicts survivors of sepsis. *Molecular Medicine*. 2020; 26: 6.
10. Smeeth L, Thomas S L, Hall A J, Hubbard R, Farrington P and Vallance P. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N Engl J Med*. 2004; 351(25): 2611-2618.
11. Davydow D S, Hough C L, Langa K M and Iwashyna T J. Symptoms of depression in survivors of severe sepsis: a prospective cohort study of older Americans. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2013; 21(9): 887-897.
12. Iwashyna T J, Ely E W, Smith D M and Langa K M. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 2010; 304(16): 1787-1794.
13. Prescott H C, Osterholzer J J, Langa K M, Angus D C and Iwashyna T J. Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *BMJ*. 2016; 353: i2375.
14. R Sonnevile et al. Potentially modifiable factors contributing to sepsis-associated encephalopathy. *Intensive Care Med*. 2017; 43: 1075–1084.
15. Da Silva F P, Machado M C and Velasco I T. Neuropeptides in sepsis: From brain pathology to systemic inflammation. *Peptides*. 2013; 44: 135-138.
16. Calsavara A J C, Costa P A, Nobre V and Teixeira A L. Factors Associated With Short and Long Term Cognitive Changes in Patients With Sepsis. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 4509.
17. Yende S, Kellum J A, Angus D C. Long-term Host Immune Response Trajectories Among Hospitalized Patients With Sepsis. *JAMA*. 2019; 2(8): e198686.
18. Manabe T and Heneka M T. Cerebral dysfunctions caused by sepsis during ageing. *Nat Rev Immunol*. 2021; <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00643-7>.

19. Rech T H, Vieira S R and Brauner J S. Serum neuron-specific enolase as a prognostic marker after a cardiac arrest. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2006. 18(4): 396-401.
20. Weingarten M D, Lockwood A H, Hwo S Y and Kirschner M W. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; 72(5): 1858-1862.
21. Pankiewicz J E and Sadowski M J. APOE genotype and Alzheimer's immunotherapy. *Oncotarget*. 2017; 8(25): 39941-39942.
22. Thelin E P, Jeppsson E, Frostell A, Svensson M, Mondello S, Bellander B M et al. Utility of neuron-specific enolase in traumatic brain injury; relations to S100B levels, outcome, and extracranial injury severity. *Crit Care*. 2016; 20: 285.
23. Ehler J, Saller T, Wittstock M, Rommer P S, Chappell D, Zwissler B et al. Diagnostic value of NT-proCNP compared to NSE and S100B in cerebrospinal fluid and plasma of patients with sepsis-associated encephalopathy. *Neurosci Lett*. 2019; 692: 167-173.
24. Kirk R A, Kesner R P, Wang L M, Wu Q, Towner R A, Hoffman J M et al. Lipopolysaccharide exposure in a rat sepsis model results in hippocampal amyloid-beta plaque and phosphorylated tau deposition and corresponding behavioral deficits. *Geroscience*. 2019; 41(4): 467-481.
25. De Deyn P P, Vanholder R, Eloot S and Glorieux G. Guanidino compounds as uremic (neuro)toxins. *Semin Dial*. 2009; 22(4): 340-345.
26. Polito A, Brouland J P, Porcher R et al. Hyperglycaemia and apoptosis of microglial cells in human septic shock. *Crit Care*. 2011; 15(3): R131.
27. Kamada H, Yu F, Nito C and Chan P H. Influence of hyperglycemia on oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 activation after focal cerebral ischemia/ reperfusion in rats: relation to blood-brain barrier dysfunction. *Stroke*. 2007; 38(3): 1044-1049.
28. Loane D J and Byrnes K R. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*. 2010; 7(4): 366-377.

29. Yende S, D'Angelo G, Kellum J A, et al. Inflammatory markers at hospital discharge predict subsequent mortality after pneumonia and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177(11): 1242-1247.
30. Wang F, Liu J, Weng T, Shen K, Chen Z, Yu Y, Huang Q, Wang G et al. The inflammation induced by lipopolysaccharide can be mitigated by short-chain fatty acid, butyrate, through upregulation of IL-10 in septic shock. *Scand J Immunol.* 2017; 85: 258 – 263.
31. Dal-Pizzol F, Rojas H A, dos Santos E M, Vuolo F, Constantino L, Feier G, Pasquali M, Comim CM et al. Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis. *Mol Neurobiol.* 2013; 48: 62–70.
32. Chavan S S, Huerta P T, Robbiati S, Valdes-Ferrer S I, Ochani M, Dancho M, Frankfurt M, Volpe B T et al. HMGB1 mediates cognitive impairment in sepsis survivors. *Mol Med.* 2012; 18: 930–937.
33. Barichello T, Sayana P, Giridharan V V, Anithachristy S, Arumanayagam S A, Boomadevi Narendran B, Della-Giustina A, Petronilho F, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Long-Term Cognitive Outcomes After Sepsis: A Translational Systematic Review. *Mol neurobiol.* 2019; 56(1): 186 - 251.
34. Carniglia L, Ramírez D, Durand D, Saba J, Turati J, Lasagna M, et al. Neuropeptides and Microglial Activation in Inflammation, Pain, and Neurodegenerative Diseases. *Mediators of Inflammation.* 2017; 2017: 5048616.
35. Victoria Bodkin V J and Fernandes S E. TRPV1 and SP: key elements for sepsis outcome? *British Journal of Pharmacology.* 2013; 170: 1279–1292.
36. Mashaghi A, Marmalidou A, Tehrani M, Grace P M, Pothoulakis C and Dana R. Neuropeptide Substance P and the Immune Response. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73(22): 4249–4264.
37. Lorente L et al. Association between serum substance P levels and mortality in patients with severe sepsis. *J Crit Care.* 2015; 5: 924 - 928.

38. Lorente L, Martín M M, Jiménez A et al. Sustained Low Serum Substance P Levels in Non-Surviving Septic Patients. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(7): 153.
39. Mella R J, Stucchi F A, Remick D G et al. Neurokinine-1 Receptor Deficiency improve survival in murine polymicrobial sepsis through multiple mechanisms in aged mice. *Shock.* 2019; 52(1): 61 - 66.
40. Doi K, Hu X, Yuen P S, Leelahavanichkul A, Yasuda H, Kim S M, et al. AP214, an analogue of alpha-melanocyte-stimulating hormone, ameliorates sepsis-induced acute kidney injury and mortality. *Kidney Int.* 2008; 73: 1266–1274.
41. Sever I H, Ozkul B, Tanriover D E, Ozkul O, Elgormus C S, Gur S G, Sogut I, Uyanikgil Y, Cetin E O and Erbas O. Protective effect of oxytocin through its anti-inflammatory and antioxidant role in model of sepsis-induced acute lung injury: Demonstrated by CT and histological findings. *Exp Lung Res.* 2021; 47(9): 426-435.
42. Sendemir E, Kafa I M, Schafer H H and Jirikowski G F. Altered oxytocinergic hypothalamus systems in sepsis. *J Chem Neuroanat.* 2013; 52(9): 44-48.
43. Piliponsky A M, Chen C, Galli S J, et al. Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis. *Nat Med.* 2008; 14(4): 392-398.
44. Gomez S, Thompson J P and Lambert D G. Nociceptin/orphanin FQ in inflammation and sepsis. *British Journal of Anaesthesia.* 2011; 106: 6–12.
45. Zhou M, Wang P et al. The small intestine plays an important role in upregulating CGRP during sepsis. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 2001; 280: 382-388.
46. Hauser G J, Myers A K, Dayao E K and Zuowska-Grojec Z. Neuropeptide Y infusion improves hemodynamics and survival in rat endotoxic shock. *Am J Physiol.* 1993; 265: 1416-1423.
47. Pillozzi A, Carro C and Huang X. Roles of β -Endorphin in Stress, Behavior, Neuroinflammation, and Brain Energy Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 338.

48. Ninkovic J and Roy S. Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino Acids*. 2013; 45: 9–24.
49. Kido K, Shindo Y, Toda S and Masaki E . Expression of β -endorphin in peripheral tissues after systemic administration of lipopolysaccharide as a model of endotoxic shock in mice. *Ann Endocrinol*. 2019; 80(2): 117-121.
50. Da Silva F P, Machado M C C, Sallet P C, Zampieri F G, Goulart A C, Torggler F F, Barbeiro H V, Velasco I T, Da Cruz L M, and Souza H P. Neuropeptide Downregulation in Sepsis. *Inflammation*. 2013; 37: 142-145.
51. Barbeiro D F, Barbeiro H V, Zampieri F G, Machado M C C, Torggler F F, Cunha D M G, Goulart A C, Velasco I T, Da Cruz L M, De Souza H P and Da Silva F P. Cathelicidin LL-37 bloodstream surveillance is down regulated during septic shock. *Microbes and Infection*. 2013; 15: 342-346.
52. Lai Y and Gallo R L. AMPed Up Immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*. 2009; 30(3): 131-141.
53. Da Silva F P and Machado M C C. Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*. 2012; 36: 308-314.
54. Duits L A, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra P R and Nibbering P H. Expression of b-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology*. 2002; 106: 517–525.
55. Severino P, Ariga S K, Barbeiro H V, De Lima T M, Silva E P, Barbeiro D F, Machado M C C, Nizet V and Da Silva F P. Cathelicidin-deficient mice exhibit increased survival and upregulation of key inflammatory response genes following cecal ligation and puncture. *J Mol Med*. 2017; 95(9): 995-1003.
56. Li J, Li G, Jing X, Wang H et al. Assessment of clinical sepsis-associated biomarkers in a septic mouse model. *J Int Med Research*. 2018; 46(6): 2410-2422.
57. Rioux F, Kerouac R, Quirion R and St-Pierre S. Mechanisms of the cardiovascular effects of neurotensin. *Ann N Y Acad Sci*. 1982; 400: 56-74.

58. Petrie K A, Schmidt D, Bubser M, Fadel J, Carraway R E and Deutch A Y. Neurotensin Activates GABAergic Interneurons in the Prefrontal Cortex. *J Neurosci.* 2005; 25(7): 1629 –1636.
59. Okur H, Bozkurt A, Kuçukaydin M and Muhtaroglu S. Effects of naloxone on beta-endorphin and cortisol release in sepsis. *Res Exp Med.* 1996; 196(4): 247-250.
60. Da Costa L H A, Santos-Junior N N, Catalão C H R and Rocha M J A. Microglial Activation Modulates Neuroendocrine Secretion During Experimental Sepsis. *Molecular Neurobiology.* 2021; 58: 2133-2144.
61. Santos-Junior N N, Costa L H A, Catalão C H R, Kanashiro A, Sharshar T and Rocha M J A. Impairment of osmotic challenge-induced neurohypophyseal hormones secretion in sepsis survivor rats. *Pituitary.* 2017; 20(5): 515-521.
62. Wei Ng S, Zhang H, Hedge Am Bhatia M. Role of preprotachykinin-a gene products on multiple organ injury in LPS-induced endotoxemia. *J Leukoc Biol.* 2008; 83(2): 288-295.
63. Olivieri R, Michels M, Pescador B, Ávila P, Abatti M, Cucker L, Burger H, Dominguni D, Quevedo J and Dal-Pizzol F. The additive effect of aging on sepsis-induced cognitive impairment and neuroinflammation. *J Neuroimmunol.* 2018; 314: 1-7.