

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MAYKON ALVARENGA DE SOUZA

Estudo da neuroinflamação na sepse experimental e os efeitos da curcumina

Ribeirão Preto

2021

Maykon Alvarenga de Souza

Estudo da neuroinflamação na sepse experimental e os efeitos da curcumina

Versão original

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em neurociências.

Área de concentração: Neurologia

Subárea: Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha

Ribeirão Preto

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Souza, Maykon Alvarenga de

Estudo da neuroinflamação na sepse experimental e os efeitos da curcumina. Ribeirão Preto, 2021.

70 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Rocha, Maria José Alves da.

1. CLP. 2. *Curcuma longa*. 3. Hipotálamo. 4. Citocinas. 5. Inflamação sistêmica.

SOUZA, Maykon Alvarenga

Estudo da neuroinflamação na sepse experimental e os efeitos da curcumina

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em neurociências.

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Dedico este trabalho à minha amada FAMÍLIA ...

... Gabriela minha esposa, por estar sempre ao meu lado, e ser a base da minha família, me proporcionado meu maior tesouro, meus filhos maravilhosos, Manuela e Felipe.

... aos meus filhos, minha razão de viver,

... aos meus pais, Aauto e Gisela, por me proporcionarem educação e princípios que passarei adiante e, por nunca medirem esforços para que todos os meus sonhos se tornassem realidade.,

... Em especial a minha vó Cida (in memorian) pelo incentivo e dedicação, espelho de ser humano que sempre me apoiou, por suas palavras de carinho, atenção e amor que me ajudaram a vencer esta batalha.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me guiar nos momentos de maior dificuldade e preparar sempre os melhores caminhos.

À Prof.^a Dr^a Maria José Alves da Rocha, por ter aceitado esse desafio em me orientar, pela confiança, compreensão e imensa contribuição para minha vida, durante os anos em seu laboratório. Meus sinceros agradecimentos!

Aos colegas de laboratório Luis Henrique, Caíque, Nilton, Anderson por compartilharem o conhecimento de vocês, não mediram esforços para me ajudar e ensinar. Obrigado.

À Nadir pela amizade, auxílio técnico com os animais e acolhimento deixando meus dias mais fáceis

Ao Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas da FCFRP por ter cedido gentilmente a DS-17 para a realização desse estudo.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado e que de longe ou de perto sempre me proporcionaram palavras de carinho e força, fazendo os meus dias mais felizes.

Em especial a meus grandes amigos e padrinhos (Denise e André), que são o meu porto seguro e sei que posso contar em todos os momentos.

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

À Capes e CNPq pelo auxílio financeiro, bolsa nº 134106/2018-0.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento dessa dissertação.

*Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz
Onde houver ódio, que eu leve o amor
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão
Onde houver discórdia, que eu leve união
Onde houver dúvida, que eu leve a fé
Onde houver erro, que eu leve a verdade
Onde houver desespero, que eu leve a esperança
Onde houver tristeza, que eu leve alegria
Onde houver trevas, que eu leve a luz
Ó mestre, fazei que eu procure mais consolar que ser consolado
Compreender que ser compreendido
Amar que ser amado
Pois é dando que se recebe
É perdoando que se é perdoado
E é morrendo que se vive
Para a vida eterna*

São Francisco de Assis

RESUMO

SOUZA, M. A. **Estudo da neuroinflamação na sepse experimental e os efeitos da curcumina**. 2021. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A sepse está associada a altas taxas de mortalidade e morbidade, com marcantes impactos sociais e econômicos. Apesar dos avanços na compreensão de seus aspectos fisiopatológicos, abordagens terapêuticas capazes de modificar o curso da sepse ainda são limitadas. Dado seu caráter inflamatório generalizado, abordagens inovadoras para o tratamento da sepse se sustentam no emprego de compostos com papel imunomodulador e/ou antioxidante. Sob esta abordagem, estudos demonstram um potencial efeito benéfico da curcumina, composto presente na *Curcuma longa* (popularmente denominada de “Açafrão da Terra”) na resposta inflamatória da sepse. O presente trabalho investigou o efeito da administração por gavagem da dispersão sólida de curcumina (DS-17 100mg/Kg) em marcadores de atividade inflamatória e apoptótica no tecido hipotalâmico, bem como nos níveis de vasopressina, ocitocina e citocinas plasmáticas de ratos sépticos. Foram utilizados ratos Wistar Hannover (250-300g) submetidos à ligadura e perfuração cecal (CLP). Os animais foram divididos em grupo CLP ou operação fictícia e em seguida subdivididos em grupo água ou DS-17. A gavagem contendo água ou DS-17 foi administrada duas horas após as cirurgias e a coleta das amostras (tecido hipotalâmico e plasma) ocorreu 24 horas após. Animais sépticos sem tratamento apresentaram sobrevida de 71,42% comparado com o grupo séptico tratado com DS-17 que apresentou sobrevida de 100%, assim como os demais grupos controles. No entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa. A análise por western blot do tecido hipotalâmico não revelou diferenças na expressão de Bcl-2, NF- κ B, iNOS, sinaptofisina e PARP clivada entre os grupos. Não foram observadas diferenças nos níveis plasmáticos de ocitocina e vasopressina entre os grupos. Animais sépticos apresentaram níveis circulantes de IL1- β e IL-6 superiores aos grupos operação fictícia. Tais níveis foram significativamente reduzidos pela administração oral de DS-17. Os grupos submetidos à CLP, independentemente da administração de DS-17, apresentaram níveis semelhantes elevados de IL-10. Em nenhum dos grupos experimentais detectou-se TNF- α plasmático. Nossos dados indicam um efeito anti-inflamatório sistêmico da DS-17, sem efeitos nos marcadores de neuroinflamação e apoptose estudados. Assim, mais experimentos devem ser realizados para se esclarecer os mecanismos de ação da curcumina sobre os aspectos funcionais do hipotálamo durante a sepse.

Palavras chave: CLP, *Curcuma longa*, hipotálamo, citocinas, inflamação sistêmica.

ABSTRACT

SOUZA, M. A. **A study on neuroinflammation in experimental sepsis and the effects of curcumin.** 2021. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Sepsis is associated with high mortality and morbidity rates, with marked social and economic outcomes. Regardless of advances in our understanding of sepsis pathophysiology, there is still a lack in therapeutic approaches to limit sepsis progression. Considering its inflammatory nature, innovative approaches for treating sepsis are based on immunomodulatory or antioxidant therapies. In this respect, some studies show a potentially beneficial effect of curcumin, a compound of *Curcuma longa*, on the inflammatory process in sepsis. The present study investigated the effects of a gavage administration of a solid dispersion of curcumin (DS-17 100 mg/kg) on inflammatory and apoptotic markers in hypothalamic tissue, as well as plasma levels of vasopressin, oxytocin, and cytokines in sham and septic rats. Wistar Hannover rats (250-300 g) were submitted to cecal ligation and perforation (CLP), or were sham-operated. They were divided into groups that received water or DS-17. Gavage administration containing water or DS-17 was done 2 hours, after the surgeries and the rats were euthanized 24 hours after for sample collection (hypothalamus tissue and plasma). The survival rate for septic rats without treatment was 71,42%, compared to 100% for septic rats treated with DS-17, and the other controls groups. However, the differences were not statistically significant. Western blot analysis of hypothalamic tissue did not reveal differences in Bcl-2, NF- κ B, iNOS, synaptophysin, or PARP cleaved between the groups. We did not observe any difference in vasopressin and oxytocin plasma levels between the groups. Septic rats exhibited higher plasma levels of IL-1 β and IL-6, and gavage administration of DS-17 strongly reduced these levels. Septic rats, independently of DS-17 administration, exhibited elevated IL-10 levels. All experimental groups showed undetectable levels of TNF- α . Our data indicate a systemic anti-inflammatory effect following DS-17 administration, but without effects on the neuroinflammation and apoptotic markers that were studied. Thus, more experiments are needed to elucidate the role of curcumin treatment on hypothalamic function during sepsis.

Key words: CLP, *Curcuma longa*, hypothalamus, cytokines, systemic inflammation .

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAF-1	<i>Mouse apoptotic protease activating factor 1</i>
AVP	Arginina vasopressina
BAD	<i>BCL2 Associated Agonist of Cell Death</i>
BAK	<i>BCL2-antagonist/killer 1 protein</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BCA	Ácido bicinconínico
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-W	<i>Bcl-2-like protein 2</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BID	<i>BH3 interacting-domain death protein</i>
BIM	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
CEUA	Comitê de ética no uso de animais em pesquisa
CLP	Cirurgia de ligadura e perfuração cecal
DAMPs	<i>Damaged-associated molecular patterns</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS-17	Dispersão sólida de curcumina
EPM	Erro padrão da média
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
i.p.	Intraperitoneal
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF- κ B	Fator nuclear kappa beta
OF	Operação fictícia
OT	Ocitocina
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) Polymerase</i>
PBS	Tampão fosfato
PPAR- γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo gama
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
SC	Subcutâneo
SNC	Sistema nervosa central

TBE	Tribromoetanol
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TMB	3,3',5,5'- tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Definição e aspectos gerais da sepse.....	14
1.2	Fisiopatologia da sepse.....	15
1.3	Neuroinflamação e morte celular na sepse.....	20
1.4	Cúrcuma e Sepse.....	24
2	OBJETIVO	27
2.1	Objetivos Específicos.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Animais.....	28
3.2	Protocolo Experimental.....	28
3.3	Indução da sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP).....	29
3.4	Tratamento com curcumina.....	30
3.5	Coleta das amostras.....	30
3.6	Preparo do tecido cerebral para análise por western blot.....	31
3.7	ELISA- Dosagem de hormônios e citocinas no plasma.....	32
3.8	Análise estatística.....	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Análise da taxa de sobrevivência dos animais tratados com DS-17.....	34
4.2	Determinação da concentração plasmática de hormônios neurohipofisários.....	36

4.3 Avaliação da inflamação sistêmica através da determinação de citocinas plasmáticas.	37
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO 1 - CEUA	58
ANEXO 2 - TABELAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição e aspectos gerais da sepse

Sepse é definida como um conjunto de anormalidades fisiopatológicas, com potencial risco de morte, causadas por uma resposta inadequada e exacerbada de um dado hospedeiro frente a um processo infeccioso (SINGER et al., 2016; MARKWART et al., 2020).

O termo sepse tem sua origem no grego *sepein*, que significa putrefazer ou apodrecer, e esta síndrome só foi clinicamente definida no início da década de 1990 após a realização de conferência capitaneada pela *American College of Chest Physicians* (ACCP) e a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e após 10 anos, uma segunda conferência foi realizada (*International Sepsis Definitions Conference*), onde conceitos foram revistos e determinados parâmetros expandidos (LEVY et al., 2003; BRUNN; PLATT, 2006;).

Atualmente a definição de sepse deriva de um consenso da comunidade acadêmica decorrente da *Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock [Sepsis-3]*, uma conferência realizada em agosto de 2016 que objetivou, mais uma vez, rever e unificar conceitos, definir suas etapas, bem como propor abordagens para seu manejo (SINGER et al., 2016).

Além de definir sepse *per se*, a Sepsis-3 conceitua e revisa o termo choque séptico, que passa a ser definido como uma condição de sepse onde as anormalidades circulatórias, celulares e/ou metabólicas são consistentes o suficiente para aumentar substancialmente a mortalidade. Adicionalmente, define clinicamente o choque séptico como um quadro de sepse com hipotensão persistente que requer vasoconstritores para manter a pressão arterial média a pelo menos 65 mmHg e com uma concentração sérica de lactato superior a 2mmol/L (SINGER et al., 2016; VAN DER POLL et al., 2017). A Sepsis-3 aboliu ainda o termo “sepse severa”; assim atualmente se emprega apenas os termos sepse e choque séptico (SINGER et al., 2016; VAN DER POLL et al., 2017).

Em razão das altas taxas de mortalidade e morbidade associadas, além dos custos envolvidos em seu tratamento e sequelas, a sepse é vista como um problema de saúde global, com sérios impactos sociais e econômicos (MARKWART et al., 2020). Em um dos mais recentes levantamentos mundiais relativos a esta síndrome,

estima-se que em 2017 ocorreram 48,9 milhões de casos de sepse e 11 milhões de mortes relacionadas à sepse, o que representa 19,7% das mortes globais naquele ano (RUDD et al., 2020). Somado a isso, estudos demonstram que pacientes que sobrevivem à sepse apresentam problemas das mais variadas ordens, incluindo limitações físicas, fisiológicas e cognitivas (IWASHYNA et al., 2010).

A compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos na sepse avançou substancialmente nas últimas décadas, no entanto, apesar do desenvolvimento de novas terapias, ainda persiste uma alta mortalidade e morbidade. Deste modo, a busca por melhorias na abordagem e novas intervenções terapêuticas desta síndrome se faz extremamente necessária (VAN DER POLL et al., 2017).

1.2 Fisiopatologia da sepse

Sob condições normais, o organismo humano estabelece relações benéficas mútuas com uma grande variedade de microrganismos constantemente, como, por exemplo àqueles que colonizam o trato digestivo, a orofaringe e outras mucosas. A infecção se estabelece quando a colonização de um hospedeiro por um determinado microrganismo deixa de ser benéfica ou neutra e passa a causar prejuízos, perturbando a fisiologia e trazendo danos funcionais. Mais detalhadamente, o dicionário médico ilustrado de Dorland (DORLAND, W. A. NEWMAN; ZIMENKOV'S'KYI, BORYS; DZUL, 2011) define infecção como:

Invasão e multiplicação de microrganismos em tecidos do hospedeiro, as quais podem ser clinicamente inaparentes ou resultar em injúria celular local devido ao metabolismo competitivo, toxinas, replicação intracelular ou resposta humoral.

Nesse sentido, as infecções podem ser causadas por diferentes tipos de microrganismos como vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos (THOMSON; SMITH, 1994; BOWLER, 2002; DREXLER, 2010). Quando voltamos nossa atenção para os agentes causadores da sepse, estudos demonstram que a maioria dos casos podem ser atribuídos a bactérias, podendo ser Gram-positivas, Gram-negativas e anaeróbicas. Adicionalmente, também há número considerável de casos atribuídos a fungos e, menos comumente a vírus e parasitas (MARTIN et al., 2003; TABAH et al., 2012; CHUN et al., 2015; LIN et al., 2018).

A capacidade de preservar sua integridade e funcionalidade frente a ameaças é uma característica indispensável dos seres vivos. É com essa finalidade protetora

que o sistema imune, em diversas situações, inicia processos inflamatórios. A inflamação é uma resposta do hospedeiro a uma lesão tecidual que pode ser causada por patógenos, substâncias químicas, calor, agentes físicos e, em certos casos, pelo próprio hospedeiro através de processos autoimunes. A finalidade da inflamação é eliminar o agente lesivo (quando possível) e restaurar os tecidos afetados aos seus estados estruturais e funcionais normais (NATHAN, 2002; RANG et al., 2007; NATHAN; DING, 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; HALL, 2017).

Do ponto de vista da inflamação, a manifestação da sepse é marcada por um conjunto de sinais e sintomas decorrente de um estado inflamatório generalizado e exacerbado. Entender a fisiopatologia da sepse passa, necessariamente, pela compreensão de como uma resposta inflamatória que inicialmente deveria ter caráter protetivo e homeostático, eliminando o agente infeccioso, mas que se torna hiperpolarizada e danosa ao organismo (PEREIRA JUNIOR et al., 1998). Assim, é essencial destacar que apesar de a infecção ser o evento desencadeante da sepse, a resposta imune hiperpolarizada frequentemente perdura mesmo após a resolução da infecção (VAN DER POLL et al., 2017). A fisiopatologia da sepse possui caráter complexo, visto que é uma condição multifatorial, dependente da interação de componentes infecciosos, imunológicos, endócrinos, hemodinâmicos, cardiovasculares e genéticos (PUGNER et al., 2000; BRUNN; PLATT, 2006).

Para que uma resposta inflamatória cumpra seu papel homeostático é indispensável um equilíbrio entre sinais pró e anti-inflamatórios. Quando este equilíbrio ocorre a inflamação se resolve, o agente lesivo é eliminado e os tecidos afetados são restaurados recuperando estrutura e função (NATHAN, 2002; RANG et al., 2007; NATHAN; DING, 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; HALL, 2017). Sob este ponto de vista, por muito tempo, acreditava-se que a sepse seria sustentada tão somente por uma resposta pró-inflamatória exacerbada à infecção. Contudo, atualmente sabe-se que a patogênese da sepse também envolve resposta imunossupressora excessiva. (VAN DER POLL et al., 2017).

Uma vez estabelecida a infecção, por meio de mecanismos da imunidade inata, o patógeno é detectado pelas células do hospedeiro. Tal detecção ocorre por intermédio de proteínas receptoras presentes nas células do hospedeiro denominadas de receptores de reconhecimento de padrões (do inglês, *pattern recognition receptors* - PRR's). O sistema de PRR's inclui uma série de receptores transmembrana com a capacidade de detectar os mais variados componentes de organismos externos.

Dentre a variedade de moléculas compondo o grupo dos PRR's estão os “*Toll-like receptors*” (TLR's). Existem 10 tipos de TLRs funcionais descritos em humanos sendo atribuída a cada um deles funções distintas no reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e nas respostas imunes. Adicionalmente, problemas em mecanismos de regulação negativa destes receptores são implicados em diversas doenças autoimunes e na sepse (KAWAI; AKIRA, 2010; VAN DER POLL et al., 2017).

Os PAMPs incluem proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e lipoproteínas. De maneira interessante, o reconhecimento dos PAMP's por parte dos PRR's não ocorre somente na membrana citoplasmática, mas também em lisossomos e endossomos após processos fagocíticos. A ativação dos PRR's pelos PAMP's desencadeia uma série de respostas imunes, como a liberação de fatores inflamatórios, com o intuito de conter a infecção. (AKIRA; TAKEDA, 2004; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; KAWAI; AKIRA, 2010; VAN DER POLL et al., 2017).

Paralelamente à presença dos PAMP's, o próprio hospedeiro também é responsável pela liberação de padrões moleculares importantes para a resposta imune. São eles os padrões moleculares associados a dano (*damage-associated molecular patterns* – DAMP's) e as armadilhas extracelulares de neutrófilos (*Neutrophil extracellular traps* – NETs) (DENNING et al., 2019).

Os DAMPs são proteínas nucleares, mitocondriais e citosólicas provenientes de células do hospedeiro liberadas ativamente em resposta a mediadores inflamatórios ou passivamente após lesão ou morte celular. Assim como os PAMPs, os DAMPs também são reconhecidos pelos PRRs, recrutando a mesma maquinaria celular e atuam como potentes ativadores do sistema imune pelo recrutamento de cascatas pró-inflamatórias. Os DAMPs são conhecidos pela capacidade de gerar intensas respostas inflamatórias não infecciosas após lesão tecidual (RUBARTELLI; LOTZE, 2007; DENNING et al., 2019).

Em resposta a estímulos como o contato com microrganismos, os neutrófilos liberam as NETs, estruturas em forma de teia formadas por cromatina e histonas associadas a proteínas/peptídeos microbicidas como, por exemplo elastase, mieloperoxidase, catepsina G e gelatinase. Estas redes tem como intuito reter os patógenos e destruí-los pela ação enzimática, sendo fundamentais na eliminação da infecção. Além disso, várias das moléculas presentes na NET funcionam como

efetores imunológicos e sinalizadores pró-inflamatórios (KAPLAN; RADIC, 2012; DENNING et al., 2019).

Junto com a presença dos PAMPs, a liberação dos DAMPs e NETs constituem importantes fatores para a geração da resposta de combate as infecções. Porém, uma série de estudos tem demonstrado que a despeito de seus papéis benéficos, níveis aumentados de DAMPs e NETs estão diretamente relacionados a maior severidade dos quadros de sepse. Por este viés, estudos demonstram que tais moléculas sinalizadoras desencadeiam um ciclo vicioso de sinalização que promove uma ativação imune exacerbada e sustentada, onde cada vez mais, mediadores inflamatórios são liberados dificultando uma resposta homeostática (CHAN et al., 2012; KAPLAN; RADIC, 2012; GENTILE; MOLDAWER, 2013; DEUTSCHMAN; TRACEY, 2014; BRINKMANN, 2018; LI; TABLIN, 2018).

De maneira interessante, uma série de estudos demonstra que terapias voltadas para a neutralização de determinados DAMPs, bem como terapias que limitam os processos intracelulares de formação de NETs, mostram-se efetivas em modelos animais (DENNING et al., 2019).

Normalmente, a resposta imune decorrente da sinalização descrita acima elimina o patógeno invasor sem maiores problemas, e caminha para uma resolução de caráter benéfico. Ainda assim, em certos casos, o patógeno consegue transpor a imunidade do hospedeiro, continuar se multiplicando e se estabelecendo nas mais variadas localidades, continuando a estimular o sistema imune. Tal estímulo sustentado, juntamente com a reverberação dos sinalizadores há pouco descritos, estabelece o quadro de sepse. De modo interessante, nestes pacientes, ao mesmo tempo em que se observa inflamação excessiva sustentada, também é possível notar diversas respostas imunossupressoras, com a secreção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, por exemplo (RUSSELL, 2006). No entanto, devido ao caráter aberrante de ambas, apesar dos aspectos antagônicos, não ocorre resolução. Ademais, observa-se que a predominância de cada uma destas respostas varia de caso para caso (VAN DER POLL et al., 2017; VENET; MONNERET, 2018).

Após a iniciação da inflamação pelos PAMPs, DAMPs e NETs, diversos mecanismos celulares são recrutados no estabelecimento da resposta inflamatória. Nesse cenário, o fator nuclear- κ B (NF- κ B) possui papel central. Tal fator é produzido em resposta a diversos estímulos, como os descritos acima, por meio de uma série de reações de clivagem e fosforilação de precursores proteicos, então, é translocado

para o núcleo, induzindo a transcrição de diversos genes cujo produtos modificam a função celular e atuam como sinalizadores pró-inflamatórios, entre eles, o fator de necrose tumoral (TNF), e as interleucinas 6, 12, 18 e 1 β (ABRAHAM, 2003; HOESEL; SCHMID, 2013).

Assim, em consequência à potente ativação de mecanismos inflamatórios descritos acima, um conjunto de alterações funcionais se manifesta, constituindo o quadro característico da sepse. Tais alterações incluem: ativação do sistema complemento, alterações endoteliais e do sistema de coagulação (SCHOUTEN et al., 2008; VAN DER POLL et al., 2017).

A ativação do sistema complemento promove a liberação de seus fragmentos pela circulação, os quais possuem potentes efeitos pró-inflamatórios, causando recrutamento e ativação de células endoteliais, plaquetas e leucócitos. Na sepse, a ativação do sistema complemento possui caráter descontrolado, transpondo o caráter protetivo desta resposta o que leva a dano tecidual excessivo e falência orgânica. Particularmente, os fragmentos C3a e C5a são descritos como grandes responsáveis pelos impactos negativos do sistema complemento na sepse, de maneira que terapias experimentais voltadas para suas ações tem se mostrado promissoras no controle das respostas inflamatórias (GUO; WARD, 2005; MARKIEWSKI; DEANGELIS; LAMBRIS, 2008; SILASI-MANSAT et al., 2010).

Alterações da barreira endotelial consistem em um acontecimento chave na fisiopatologia da sepse. A competência da barreira endotelial se deve diretamente a todo o sistema de adesão célula-célula composto por diversas moléculas adesivas. De um modo geral, em processos inflamatórios, plaquetas e leucócitos se aderem ao endotélio e migram para o sítio de infecção. Na sepse, por conta da resposta inflamatória exacerbada, a migração ocorre de maneira excessiva e generalizada causando comprometimento da integridade endotelial o que leva a extravasamento de proteínas plasmáticas e do próprio plasma para os tecidos, edema e redução da circulação microvascular. Estes acontecimentos contribuem para a hiperpolarização da resposta inflamatória e perda de função tecidual. Além disso, o comprometimento da circulação microvascular prejudica o aporte de nutrientes e oxigênio, e a remoção de resíduos metabólicos, agravando o comprometimento tecidual. Adicionalmente, sem microcirculação as próprias respostas imunes celulares são prejudicadas (SCHOUTEN et al., 2008; DARWISH; LILES, 2013; MIKACENIC et al., 2015;).

No curso do estabelecimento da sepse ainda observamos uma forte ativação do sistema de coagulação, que em aspectos clínicos se traduz em trombose e hemorragia, a qual se deve ao consumo excessivo de plaquetas e fatores de coagulação (VAN DER POLL et al., 2017). Nesse sentido, o fator tecidual é pontuado como um dos principais responsáveis pela coagulação na sepse. Em modelos animais com primatas, intervenções voltadas ao controle da coagulação via fator tecidual estão associadas a bons resultados, incluindo prevenção de falência orgânica e redução de mortalidade (SCHOUTEN et al., 2008; LEVI; VAN DER POLL, 2017). Complementarmente, as próprias NETs atuam facilitando a formação de trombos por sua ação com caráter de rede. As NETs ligam-se a moléculas como fator de Von Willebrand, fibronectina e fibrinogênio criando agregados de plaquetas e hemácias. Em modelos animais, intervenções que reduzem a formação de NETs são capazes de minimizar os efeitos coagulantes da sepse (VON BRÜHL et al., 2012; MARTINOD; WAGNER, 2014; LEVI; VAN DER POLL, 2017).

Por fim, como citado anteriormente, na progressão do quadro de sepse, a imunossupressão também possui papel altamente relevante. Basicamente, a imunossupressão decorre de exaustão linfocitária, marcada por intensa depleção de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, linfócitos B e células dendríticas. Esta depleção se dá em decorrência da apoptose dessas células imunes (SINGER et al., 2016; VENET; MONNERET, 2018). Paralelamente, a imunossupressão também se deve a uma reprogramação de células apresentadoras de antígeno a qual resulta em uma menor expressão, por monócitos circulantes, de receptores HLA-DR responsáveis pela apresentação de antígenos peptídeos de origem externa, bem como na redução por parte de monócitos e macrófagos na liberação de citocinas pro-inflamatórias frente a estimulação (VAN DER POLL et al., 2017).

1.3 Neuroinflamação e morte celular na sepse

A liberação massiva dos mediadores inflamatórios envolvidos na sepse tem caráter difuso, assim, os mais variados tecidos são afetados por suas ações, incluindo o sistema nervoso central (SNC), que mesmo possuindo um sistema imune próprio e sendo protegido pela barreira hematoencefálica, sofre prejuízos decorrentes do estado inflamatório generalizado (DOERSCHUG et al., 2007; MENESES et al., 2019).

Durante a sepse, mediadores inflamatórios, bem como células imunes provenientes da periferia, conseguem adentrar o SNC através de órgãos

circunventriculares, regiões encefálicas especializadas que não possuem barreira hematoencefálica. Adicionalmente, a constante e exacerbada presença de citocinas e espécies reativas de oxigênio circulantes causam alterações estruturais na barreira hematoencefálica, levando a aumento de sua permeabilidade (DANIELSKI et al., 2018; MENESES et al., 2019).

A presença das citocinas e células inflamatórias provenientes da periferia no SNC acabam por constituir um estímulo para a ativação e proliferação de células da glia. Estas células, majoritariamente micróglia e astrócitos, passam a produzir e secretar mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas, IL-6, IL-1 β , TNF- α além do óxido nítrico. Tal ativação do sistema imune central também contribui para aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e promove o recrutamento de células imunes periféricas (GUALTIEROTTI et al., 2017; DANIELSKI et al., 2018).

Há evidência de que a IL-1 β derivada das células da micróglia é a responsável pela inflamação no hipocampo e no córtex cerebral e que leva à disfunção cognitiva e sináptica durante a sepse experimental (MINA et al., 2014). As células gliais, porém, também tem participação na manutenção da homeostase cerebral em situações não-patológicas. Já foi demonstrado seu papel na regulação da neurogênese através da remoção de células progenitoras neurais apoptóticas (CUNNINGHAM, MARTÍNEZ-CERDEÑO; NOCTOR, 2013); na fagocitose de sinapses neuronais fracas ou disfuncionais (SCHAFER et al., 2012; JI et al., 2013); no suporte neuronal através da liberação de fatores tróficos (UENO et al., 2013); na eliminação de células mortas e debris em todo o SNC (TAKAHASHI, ROCHFORD; NEUMANN, 2005), dentre outras funções.

A resposta neuroinflamatória pode possuir progressão limitada adquirindo caráter agudo, o qual por si só já apresenta diversos prejuízos funcionais. No entanto, se o estímulo persistir, a neuroinflamação adquire caráter crônico com prejuízos ainda maiores. Como abordado anteriormente, é muito comum que o quadro inflamatório séptico se estenda mesmo após o controle da infecção. Deste modo, é comum o estabelecimento de processos neuroinflamatórios crônicos após quadros de sepse, os quais são marcados por morte celular com prejuízos funcionais (GUALTIEROTTI et al., 2017; DANIELSKI et al., 2018).

Como exemplo importante e altamente recorrente de alterações neuronais decorrentes da neuroinflamação na sepse podemos citar o comprometimento do eixo hipotálamo-hipófise, o qual acarreta importantes alterações neuroendócrinas como

secreção insuficiente do hormônio arginina vasopressina (AVP) (CORRÊA et al., 2007; PANCOTO et al., 2008). Em pacientes, a deficiência na secreção deste hormônio, que possui ação vasoconstrictora, contribui para o óbito por meio da indução de um quadro hipotensivo culminando com choque (SHARSHAR et al., 2003; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009).

A deficiência na secreção de AVP durante a sepse pode ser explicada por diversos mecanismos, como a depleção dos estoques neurohipofisários (HOLMES et al., 2001; SHARSHAR et al., 2003; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009), a alteração dos reflexos autonômicos (HOLMES et al., 2001; PANCOTO et al., 2008), a excessiva produção central de óxido nítrico (SHARSHAR et al., 2003; GIUSTI-PAIVA et al., 2005; CORREA et al., 2007) e, mais recentemente, pela apoptose de neurônios vasopressinérgicos (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2013; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2014; DA COSTA et al., 2017 a,b).

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) e na ativação de receptores do tipo V1a na musculatura lisa vascular, que leva à vasoconstricção (FUJIWARA et al., 2012; PARK; KWON, 2015) e na adenohipófise encontramos receptores do tipo V1b, que potencializam a produção de ACTH (TOM; ASSINDER, 2010). 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 (HOLLENBERG, 2011).

Embora seja muito conhecido a vasopressina na sepse, existem poucos relatos clínicos sobre as consequências das alterações da secreção de ocitocina que, conforme se observa na sepse experimental, acompanha o perfil da secreção de vasopressina (DA SILVA et al., 2017).

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

Há várias explicações para a redução da secreção desses hormônios durante o agravamento da sepse e, nos últimos anos, nosso laboratório tem investigado tais explicações encontrando comprovações utilizando o modelo de ligação e perfuração cecal (DA COSTA et al., 2017a).

Recentemente foi observado que marcadores oxidativos de apoptose se encontram em níveis elevados nos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo, onde se localizam os neurônios produtores de AVP e ocitocina (OT), o que sugere morte destes neurônios por apoptose (DA COSTA et al., 2017a).

A apoptose é definida como morte celular programada, e possui papel crucial nos processos de embriogênese; desenvolvimento normal; manutenção de alguns tecidos adultos, onde a renovação celular é necessária; e na resposta imune, quando as células do organismo sofrem algum tipo de lesão (BASSO et al., 2008). Dentro da maquinaria bioquímica envolvida na apoptose, as caspases são reconhecidas como elementos desencadeadores. As caspases compreendem uma família de proteases que uma vez clivadas, são ativadas para iniciar um processo proteolítico ativando outras pró-caspases e ampliando a sinalização para morte celular (ELMORE, 2007).

A caspase-3 é considerada uma das mais essenciais no processo de morte celular, sendo responsável pela destruição nuclear e alterações no citoesqueleto. A via intrínseca que inicia a apoptose é essencialmente dependente das mitocôndrias. Estímulos danosos (radiação, hipoxia, óxido nítrico, citocinas, etc.) provocam um desequilíbrio entre proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bid, Bad, Bim) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w), permitindo o extravasamento de citocromo-c mitocondrial no citosol que, juntamente com o fator de ativação da protease apoptótica 1 (Apaf-1), ativa a caspase-9 para formar o apoptosoma e clivar a caspase-3 transformando-a em caspase-3 ativada (DA COSTA et al., 2017a). Dentro da cascata da apoptose a caspase-3 ativada possui papel executor, ou seja, atua clivando diversos substratos vitais ao funcionamento da célula, levando a fragmentação das membranas, tanto extracelular como nuclear e clivagem do DNA o que produz uma desintegração da estrutura normal da célula (LAWEN, 2003; PORTER; JÄNICKE, 1999).

Dentre os vários substratos da caspase-3 ativada, a Poly (ADP- ribose) polymerase-1 (PARP-1) assume papel de destaque no comprometimento das funções celulares. A PARP-1 é uma proteína nuclear envolvida em numerosos processos celulares. Inicialmente, foi identificada como responsável pela reparação de DNA

danificado, iniciando o reparo de excisão de base. No entanto, a PARP-1 também é implicada em vários outros processos, como transcrição, vasoconstrição, regulação da função de astrócitos e micróglia, bem como memória de longo prazo (CHAITANYA; ALEXANDER; BABU, 2010; CHIARUGI; MOSKOWITZ, 2003; KRAUS; LIS, 2003; PORTER; JÄNICKE, 1999). Como retrato do papel fundamental da PARP-1 nas funções celulares, podemos citar que esta proteína é implicada na regulação de 60 a 70% dos genes que controlam o metabolismo, ciclo e transcrição celulares (CHAITANYA; ALEXANDER; BABU, 2010). Neste contexto, é importante observar que a PARP-1 interage e regula a função de fatores de transcrição como NF- κ B, NFAT-1, ESF-1 e ELK-1 (OLABISI et al., 2008; SIMBULAN-ROSENTHAL et al., 2003; ZINGARELLI et al., 2003) e está envolvida nas respostas inflamatórias do sistema nervoso central, como a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e óxido nítrico por parte de astrócitos (PHULWANI; KIELIAN, 2008). Deste modo, por ser um importante substrato da caspase-3 e estar implicada em grande parte das funções celulares, a clivagem da PARP-1 é um marcador de apoptose amplamente usado (CHAITANYA; ALEXANDER; BABU, 2010).

1.4 Cúrcuma e Sepses

Pesquisas clínicas ou experimentais têm sido realizadas no intuito de avaliar as terapias convencionais assim como as inovadoras no tratamento da sepses (MUENZER et al., 2010).

Na busca por novos tratamentos, a curcumina, composto químico presente em uma planta tropical denominada de *Curcuma longa*, foi recentemente utilizada em modelo experimental de sepses, sendo capaz de atenuar danos teciduais, reduzir a mortalidade e diminuir a expressão do TNF- α (SIDDIQUI et al., 2006).

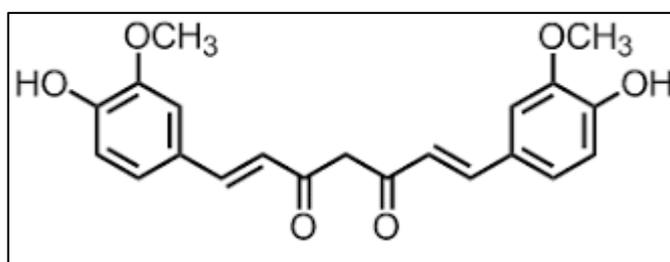
A *Curcuma longa* (neste trabalho chamada de cúrcuma) é uma erva rizomatosa que pertence à família Zingiberaceae e contém óleos essenciais, óleos graxos e 2-5% de curcuminóides (BEGAN et al., 2000), foi trazida ao Brasil no início da colonização pelos portugueses e atualmente recebe o nome de “Açafrão da Terra” (TEIXEIRA, 2009).

Tradicionalmente, a cúrcuma é utilizada em alimentos, cosméticos e na medicina. Como especiaria, é usada como tempero dos alimentos com sua distinta cor amarela e sabor, sendo utilizada para dar cor a queijos, manteigas e outros alimentos. Na medicina popular, a cúrcuma tem sido aplicada em preparações terapêuticas ao longo

dos séculos em diferentes partes do mundo (GOEL, KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008).

A curcumina foi isolada pela primeira vez por Voguel em 1842 (COOKSEY, 2017) sendo uma substância insolúvel em água e éter, mas solúvel em etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (YU et al., 2020).

Sua estrutura (figura 1) foi descrita por Lampe e Milobedeska em 1910 (MILOBEDESKA, J.; KOSTANECKI, V.; LAMPE, 1910) e quimicamente é um polifenol (diferuloilmetano) com a fórmula: $C_{21}H_{20}O_6$ e peso molecular: 368,37.



Fonte: SUETH-SANTIAGO et al., 2015.

Figura1: Estrutura química da curcumina.

A atividade anti-inflamatória da *Curcuma longa* é atribuída aos grupos fenólicos presentes na estrutura dos curcuminoides: curcumina (77%), demetoxicurcumina (17%) e bisdemetoxicurcumina (AGGARWAL et al., 2003).

O efeito benéfico desse fitoterápico na sepse pode ser atribuído na regulação da expressão de receptores ativados de proliferação do peroxissomo (PPARs) que são fatores de transcrição membros da família de receptores nucleares. O aumento da expressão de uma das proteínas desta família, a PPAR- γ pela curcumina leva à diminuição da liberação de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 e 6 e ao aumento de mediadores anti-inflamatórios, levando a um efeito protetor de sepse e melhora do quadro infeccioso. A ativação de PPAR- γ também tem uma tarefa crucial na regulação da proliferação, metabolismo, diferenciação, desenvolvimento e respostas inflamatórias do sistema nervoso central (SHISHODIA; SINGH; CHATURVEDI, 2007). Desta maneira agonistas de PPAR- γ tem significantes potenciais terapêuticos em doenças neurológicas (GHASEMI et al., 2019).

Possíveis mecanismos de ação da curcumina na sepse podem também estar associados com a inibição do NF- κ B, ou com a proteína do choque térmico (“heat shock protein”) (SIDDIQUI et al., 2006).

Outro fato interessante é que a curcumina atenua significativamente a adesão plaquetária e de leucócitos na microcirculação cerebral (VACHHARAJANI et al., 2010), inibindo ainda a atividade da Map-quinase levando a uma diminuição da produção de mediadores inflamatórios em ratos (CARTER et al., 2002), diminuindo o estresse oxidativo através da redução de superóxido, supressão da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas (SOMPAMIT et al., 2009).

Dados na literatura relatam que a curcumina tem um significativo efeito hepatoprotetor, pois é capaz de reduzir a liberação de enzimas hepáticas diminuindo a expressão de RNAm para IL-6 e TNF- α no tecido hepático, atenuando a injúria hepática frente a um estímulo séptico (SEEHOFER et al., 2010). Recentemente verificou-se que uma dispersão sólida da curcumina (DS-17) proveniente do Laboratório do Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas da FCFRP, foi capaz de reverter alguns parâmetros inflamatórios decorrentes de sepse experimental levando a um aumento temporal da sobrevivência (DA SILVA et al., 2017). Em outro estudo, os pesquisadores mostraram que a DS-17 na dose de 100mg/Kg, por via oral, duas horas após a injeção intraplantar de carragenina, foi capaz de diminuir o edema no membro dos ratos provocado pela administração dessa droga (TEIXEIRA, 2009).

Frente aos benefícios descritos sobre a ação desta dispersão e a escassez de literatura específica, o presente estudo buscou avaliar os efeitos deste composto, a sobre a neuroinflamação decorrente da sepse.

2 OBJETIVO

Investigar as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes de uma dispersão sólida de curcumina (DS-17) e seu possível efeito neuroprotetor na sepse polimicrobiana experimental induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP) em ratos.

2.1 Objetivos Específicos

- i)** Verificar os efeitos da DS-17 na resposta inflamatória e apoptótica do hipotálamo de animais sépticos ou controles, por meio da detecção e análise do conteúdo de iNOS, NF- κ B, Bcl-2 e PARP clivada;
- ii)** Verificar os efeitos da DS-17 curcumina na secreção de vasopressina e ocitocina e na produção das citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α) no plasma ou soro de animais sépticos ou controles.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

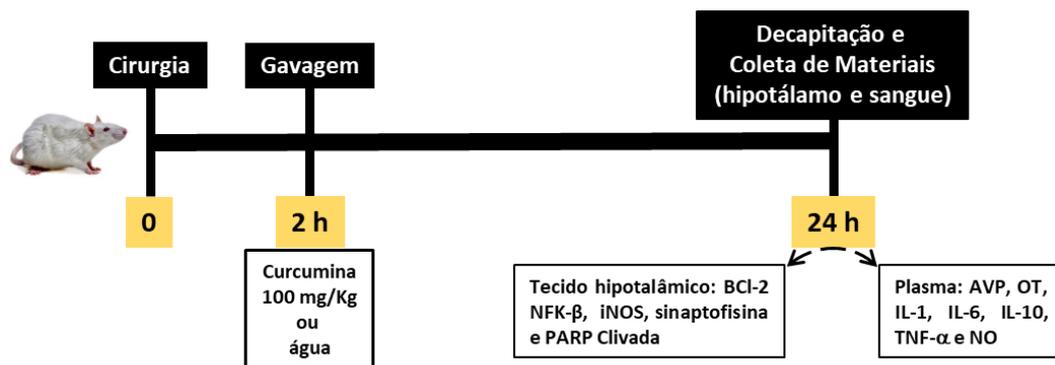
Os experimentos foram realizados com 40 ratos “Wistar Hannover” machos adultos, com peso corporal entre 250 e 300 gramas, provenientes do Biotério Central e encaminhados ao Biotério I da Faculdade de Odontologia da USP de Ribeirão Preto.

No Biotério I os animais foram ambientados pelo período de uma semana em caixas coletivas sendo mantidos em temperatura ambiente de 24 ± 1 °C com ciclos de 12 horas claro-escuro, livre acesso à água potável e ração comercial balanceada (Nuvilab CR-1 Autoclavável, NUVITAL Nutrientes S/A).

Esse trabalho foi submetido ao CEUA – FORP/USP e aprovado sobre o protocolo nº 2018.1.403.58.4 em 13 de junho de 2018, conforme anexos 1 e 2.

3.2 Protocolo Experimental

O protocolo teve início com os procedimentos cirúrgicos onde parte dos animais foram submetidos a CLP para indução de sepse e parte à operação fictícia (OF). Em seguida, estes dois grupos foram subdivididos e, duas horas após os procedimentos cirúrgicos os animais receberam por gavagem, em dose única, uma dispersão sólida da curcumina (DS-17) dissolvida em água, ou, somente água (veículo). A dose de DS-17 administrada foi de 100 mg/kg de peso corporal, em 3,7 ml de volume para cada 100g, o mesmo volume foi oferecido de água. Vinte e quatro horas após as cirurgias os animais foram decapitados sendo coletados o sangue e o cérebro para dosagens plasmáticas de citocinas e hormônios, e para a análise da expressão proteica de marcadores no hipotálamo, conforme esquema representado na figura 2.



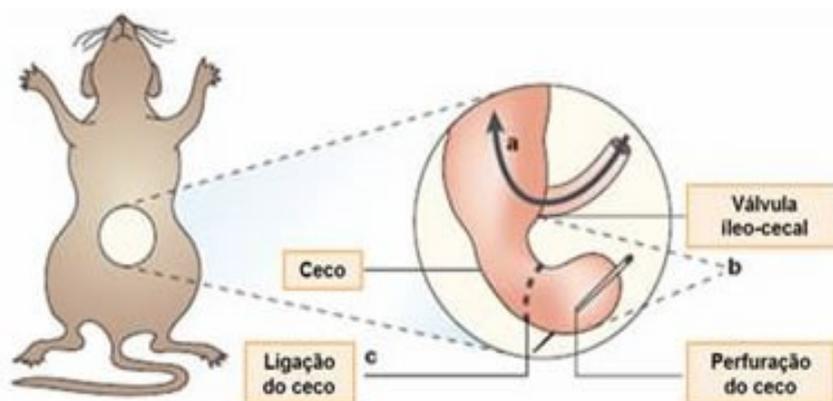
Fonte: Próprio autor

Figura 2: Esquema temporal do protocolo experimental

3.3 Indução da sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP)

A indução da sepse foi realizada por um modelo de ligadura e perfuração cecal (“Cecal Ligation and Puncture”) padronizado em nosso laboratório (DA COSTA et al., 2017a; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2013; WAHAB et al., 2015).

Todos os animais submetidos à intervenção cirúrgica foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de solução de tribromoetanol (TBE) 2,5% (Sigma -Aldrich) em solução salina, na dose de 1 mL/100 g de peso corporal. Após a realização de tricotomia na região abdominal, os ratos foram colocados em mesa cirúrgica e realizada assepsia local com álcool iodado. Os animais foram submetidos à laparotomia com incisão longitudinal de aproximadamente cinco centímetros e subsequente exteriorização do ceco. Dois terços distais do ceco foram ligados, promovendo uma obstrução parcial do lúmen intestinal; esse local foi perfurado duas vezes com uma agulha 16 G no grupo CLP (figura 3). O intestino foi reintroduzido na cavidade abdominal após verificação da saída das fezes pelas perfurações; e então foi realizada a rafia em dois planos com pontos simples separados. No grupo controle, operação fictícia (OF), os animais foram submetidos à mesma técnica cirúrgica de laparotomia, com exteriorização e manipulação do ceco, porém sem a ligadura ou perfuração.



Fonte: Buras *et al.*, 2005

Figura 3: Esquema temporal do protocolo experimental

Posteriormente a realização das cirurgias CLP ou OF, os ratos receberam uma administração de solução salina 0,9% estéril, na dose de 7 mL por animal, por via subcutânea (SC) para reposição de fluídos. A confirmação do quadro de sepse, foi feita com base nos sinais apresentados pelos animais, os quais incluíram letargia, piloereção, redução do comportamento de *grooming* e taquipneia.

3.4 Tratamento com dispersão sólida de curcumina (DS-17)

Duas horas após os procedimentos cirúrgicos para CLP ou OF os animais receberam por gavagem uma dispersão sólida de curcumina (DS-17) dissolvida em água na dose de 100 mg/Kg ou somente água (grupo controle). A dispersão sólida de curcumina, neste trabalho denominada de DS-17, foi desenvolvida no Laboratório de Desenvolvimento Industrial e Farmacêutico (laboratório do Prof. Dr. Luis Alexandre P. de Freitas- FCFRP/USP).

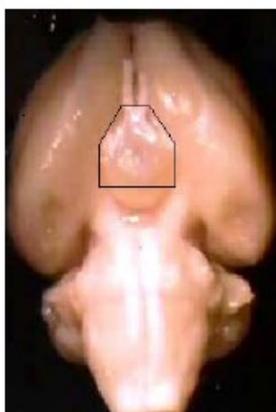
3.5 Coleta das amostras

Para a obtenção das amostras todos animais foram decapitados 24 horas após a realização da CLP ou OF, sem procedimento anestésico para assegurar a não interferência na dosagem plasmática dos hormônios de nosso interesse.

As amostras de sangue foram coletadas do tronco do animal, em microtubos plásticos (Vacuplast – EDTA. K3, 5 mL) e centrifugado a 1600 xg, 4 °C, 20 min, para separação das fases sólida e líquida, sendo que o plasma foi dividido e armazenado

em múltiplas alíquotas, as quais foram utilizadas para determinação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) e anti-inflamatória (IL-10).

Todos os ratos foram decapitados sem procedimento anestésico para que não houvesse interferência nos hormônios estudados no experimento. O cérebro foi removido em bloco através de uma craniectomia de vértex e dissecado o hipotálamo (figura 4) que foi congelado em gelo seco e armazenado a -20°C para posteriores análises de western blot.



Fonte: ATHAYDE, 2007.

Figura 4: Foto da superfície ventral do cérebro do rato. A linha preta demarca a área do hipotálamo basal retirado para realização da quantificação por western blot.

3.6 Preparo do tecido cerebral para análise por western blot

Após descongelamento dos hipotálamos, os mesmos foram homogeneizados 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) 200 mM em metanol. Após agitação em gelo por duas horas, as amostras foram centrifugadas a 3500 xg por 20 min a 4 °C para coleta do sobrenadante. A quantidade de proteína total de cada amostra foi determinada a 592 nm usando ensaio com ácido bicinconínico (BCA) de acordo com as instruções do fabricante (Pierce BCA protein assay kit).

Quantidades iguais de proteína total (40 μ g) foram diluídas em tampão Laemmli (Sigma-Aldrich) por duas vezes e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (125 V, 90 min). Marcadores de peso molecular de 10 kDa a 245 kDa (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 (0,45 μm ; Amersham) em sistema de tanque de *blotting* sob uma corrente de 100 volts durante duas horas em tampão de transferência contendo 20% de metanol. A membrana foi incubada overnight a 4°C com anticorpos apropriados contra iNOS, NF- κ B, Bcl-2, PARP clivada e sinaptofisina. Anticorpos secundários conjugados com HRP (horseradish peroxidase) anti-rabbit (Abcam) e anti-mouse (Santa Cruz) foram diluídos 1:10.000 em PBS-T com BSA 1% e as membranas incubadas com agitação durante duas horas a 4°C.

A detecção das proteínas foi realizada usando o kit de reação quimioluminescente (ECL prime, Amersham) e as bandas detectadas quantificadas pelo software ImageLab (BioRad). Os resultados foram transformados em unidades arbitrárias de densidade óptica e expressos pela razão de β -actina (controle interno).

3.7 ELISA- Dosagem de hormônios e citocinas no plasma

Os níveis das citocinas IL-1, IL-6, IL-10 e dos hormônios vasopressina e ocitocina no plasma foram determinados pelo ensaio ELISA sanduíche.

Primeiramente, as placas de ELISA foram incubadas com 100 μL dos anticorpos em tampão de carbonato de sódio de 0.1M e pH de 8,2, incubadas durante 18 horas a temperatura de 4 °C. Os poços foram lavados com tampão fosfato salina a 0,1% (PBS/Tween-20) e bloqueados com 100 μL de soro fetal bovino (SBF) a 10% em PBS durante uma hora a temperatura ambiente. Transcorrido esse tempo, os poços foram lavados com solução de lavagem (PBS/Tween-20) e adicionados 100 μL de plasma em cada poço em duplicata.

Após duas horas da incubação a temperatura ambiente, os poços foram relavados, incubados com 100 μL (2 mg/mL) de anticorpos monoclonais biotinizados e novamente incubados com os anticorpos secundários apropriados durante uma hora a temperatura ambiente. Passado o tempo dessa segunda incubação, foi adicionado em cada poço uma pequena quantidade da enzima peroxidase e esperou-se o tempo de 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi realizada uma lavagem final com H₂SO₄ 1M, fazendo com que fosse interrompida a reação desenvolvida pela adição do substrato TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina) em cada poço.

As densidades ópticas foram determinadas em um leitor de microplaca usando 450 nm como comprimento de onda. O índice de citocinas de cada amostra foi determinado através de uma curva de diluição seriada padrão para citocinas expressa em pg/mL.

3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para análise estatística foi empregado o teste de análise de variância de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey-Kramer. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., 2007). Valores de $P \leq 0,05$ foram usados como critério para significância.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da taxa de sobrevivência dos animais tratados com DS-17

Os animais receberam, por gavagem, dose única de DS-17 (100 mg/Kg) ou água, 2 horas após à cirurgia (CLP) ou operação fictícia. Animais sépticos sem tratamento apresentaram sobrevida de 71,42% ao final das 24 horas de observação após a indução da sepse. Embora o tratamento com DS-17 não tenha mostrado nenhuma diferença estatisticamente significativa na sobrevida entre os grupos experimentais submetidos à CLP ($P = 0,8358$), todos os animais tratados com DS-17 sobreviveram no período observado. A taxa de sobrevivência dos animais pertencentes aos grupos controles (OF) foi de 100% independente do tratamento recebido (figura 5).

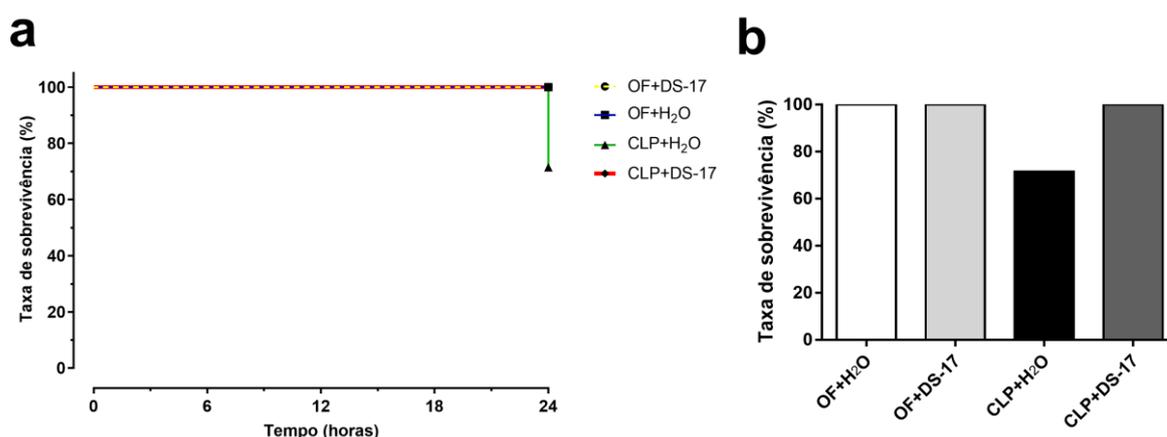


Figura 5 - Efeito do tratamento com DS-17 (100 mg/Kg) na sobrevida de ratos com sepse polimicrobiana após 24 horas. Os dados são expressos em (a) como porcentagem de sobrevivência *ao longo do tempo* (horas), demonstrando que houve mortalidade somente no grupo CLP+H₂O dentro do período de 24 horas. Em (b) a porcentagem de sobrevivência é apresentada em barras ilustrativas para cada grupo experimental. Análise estatística por *Log-rank (Mantel-Cox) Test* ($n = 6-14$ animais por grupo).

Não foram encontradas diferenças significantes na expressão proteica de Bcl-2, NF- κ B, iNOS, sinaptofisina e PARP clivada após 24 horas da indução da sepse nos grupos experimentais estudados (figuras 6 e 7).

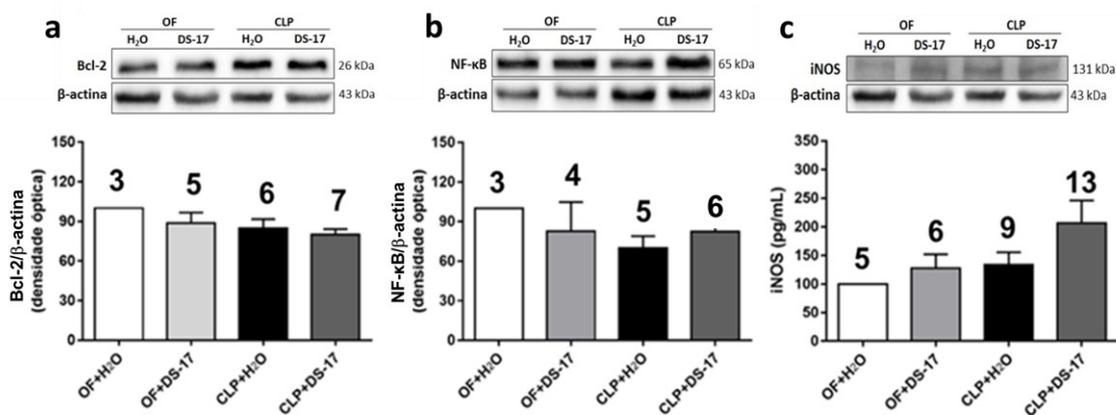


Figura 6 - Efeito do tratamento com dispersão sólida de curcumina (DS-17) 100 mg/Kg) na expressão de proteínas de interesse presentes no tecido hipotalâmico de ratos com sepse polimicrobiana 24 horas após as cirurgias. Expressão de (a) BCL-2, (b) NF- κ B, (c) iNOS, no tecido hipotalâmico dos grupos de animais estudados. OF = operação fictícia, CLP = ligação cecal e perfuração. As barras expressam a média \pm EPM (n = 3-13 animais por grupo). Análise estatística por *One-way* ANOVA e pós-teste de *Tukey*.

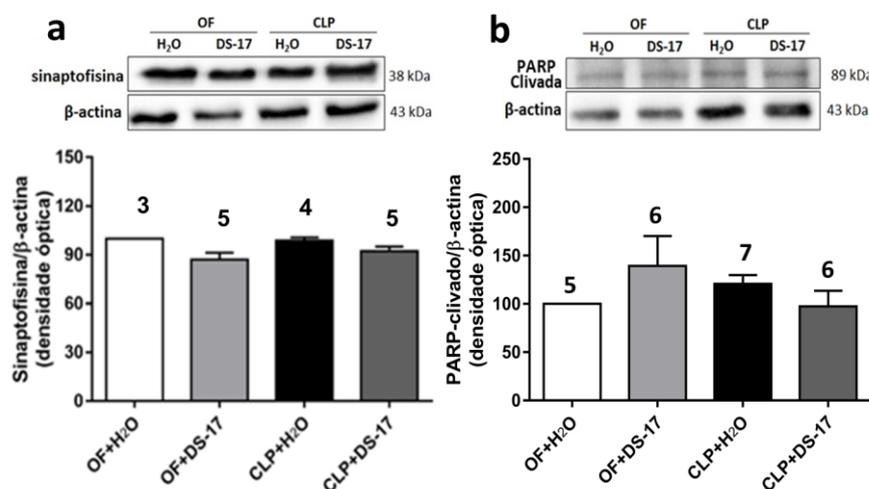


Figura 7 - Efeito do tratamento com dispersão sólida de curcumina (DS-17) 100 mg/Kg) na expressão de proteínas de interesse presentes no tecido hipotalâmico de ratos com sepse polimicrobiana 24 horas após as cirurgias. Expressão de, **(a)** sinaptofisina e **(b)** PARP clivada no tecido hipotalâmico dos grupos de animais estudados. OF = operação fictícia, CLP = ligação cecal e perfuração. As barras expressam a média \pm EPM (n = 3-7 animais por grupo). Análise estatística por *One-way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*.

4.2 Determinação da concentração plasmática de hormônios neurohipofisários

Observou-se uma tendência à diminuição dos níveis plasmáticos de vasopressina após 24 horas nos animais submetidos à sepse (figura 8a). Animais sépticos tratados com DS-17 apresentaram maiores concentrações deste hormônio quando comparados àqueles sem tratamento, no entanto, as diferenças não foram significantes ($P = 0,999$). As concentrações plasmáticas de ocitocina mantiveram-se estáveis e sem alterações significantes após 24 horas em todos os grupos experimentais (figura 8b).

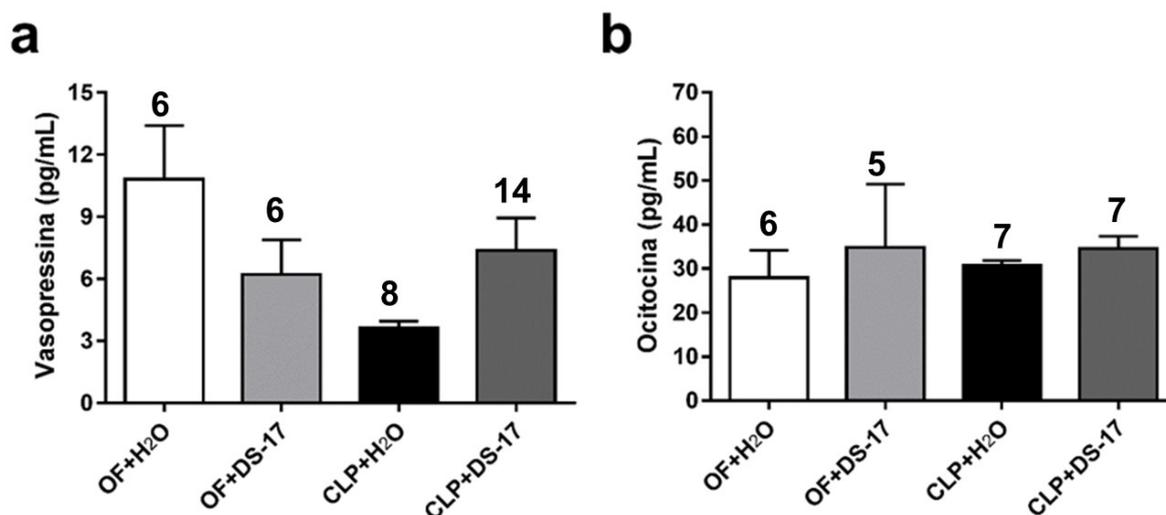


Figura 8 – Efeito do tratamento com DS-17 ,100 mg/Kg) na concentração plasmática de hormônios neurohipofisários após 24 hores de indução de sepse polimicrobiana (CLP) ou operação fictícia (OF). Concentrações plasmáticas dos hormônios **(a)** vasopressina e, **(b)** ocitocina nos grupos experimentais estudados. As

barras representam a média \pm EPM (n = 5-14 animais por grupo). Análise estatística por *One-way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*.

4.3 Avaliação da inflamação sistêmica através da determinação de citocinas plasmáticas.

Observou-se um aumento nos níveis plasmáticos de IL-1 β (P < 0,05) e IL-6 (P < 0,05) após 24 horas de indução da sepse. A administração de curcumina DS-17 aos animais sépticos atenuou o aumento dessas citocinas pró-inflamatórias (P < 0,05) quando comparados aos animais sépticos não tratados (figura 9a, b). A administração de DS-17 aos animais sépticos não interferiu na produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (figura 9c). Em 24 horas, não foi possível detectar a citocina pró-inflamatória TNF- α no plasma dos animais estudados (figura 9d).

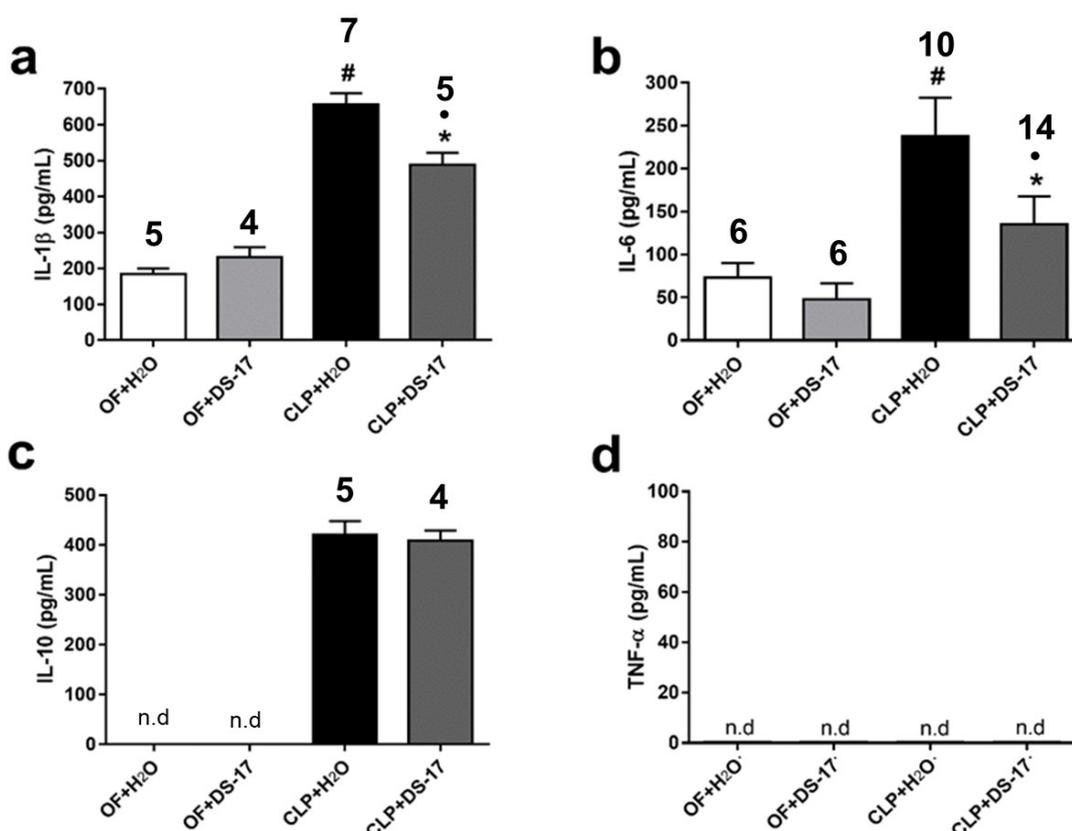


Figura 9 - Efeito do tratamento com DS-17 (100 mg/Kg) na concentração de citocinas plasmáticas em ratos com sepse polimicrobiana (CLP) ou operação fictícia após 24 horas das cirurgias. Concentrações plasmáticas de (a) IL-1 β e (b) IL-6 e (c) IL-10. Concentrações de (d) TNF- α não foram detectadas nos grupos

experimentais estudados. As barras representam a média \pm EPM (n = 3-15 animais por grupo). Análise estatística por *One-way* ANOVA e pós-teste de *Tukey*. #P < 0,05(a, b) comparado ao grupo OF+H₂O e OF+DS-17. *P < 0,05(a) comparado ao grupo OF+H₂O e OF+DS-17. †P < 0,05(a, b) comparado ao grupo CLP+H₂O

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho utilizou o modelo de sepse experimental induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP), um modelo que apesar de suas limitações, mimetiza em diversos aspectos observados a sepse humana, sendo considerado dinâmico e adequado para o estudo dos aspectos fisiopatológicos dessa doença, bem como para a avaliação de novas terapias em estudos pré-clínicos (GARRIDO; FIGUEIREDO; SILVA, 2004; DEJAGER et al., 2011). Neste sentido, durante nossos experimentos, observamos que os animais submetidos à CLP apresentaram sinais característicos de sepse, como piloereção, letargia, redução do comportamento de *grooming* e taquipneia. Além de um quadro inflamatório sistêmico evidenciado pelos níveis plasmáticos elevados de IL-1 β e IL-6 em relação aos animais submetidos à operação fictícia.

Com relação a taxa de sobrevivência, avaliada durante as 24 horas subsequentes aos procedimentos cirúrgicos, observamos que os animais sépticos não submetidos ao tratamento com DS-17, apresentaram taxa de sobrevivência de 71,42%. Já no grupo operação fictícia a taxa de sobrevivência foi de 100%. A comparação da taxa de sobrevivência com outros trabalhos que empregaram o modelo de CLP revela certa variação na taxa de mortalidade entre diferentes estudos (WU et al., 2007; TAZINAFO, 2014; DA SILVA et al., 2017; DA COSTA, 2020). No entanto, essa variação é esperada, já que o modelo de CLP acaba por promover quadros sépticos com diferentes severidades, uma vez que a variação no número de perfurações no ceco, o calibre da agulha utilizada e a quantidade de material fecal extravasada podem influenciar fortemente características da resposta inflamatória, como níveis de citocinas, tempo de evolução do quadro, gravidade e mortalidade (VILLA et al., 1995; WALLEY et al., 1996; DEJAGER et al., 2011). Além disso, diferentes espectros de bactérias entéricas podem estar envolvidos, além da possibilidade de haver ligeiras diferenças de manipulação no procedimento cirúrgico (WALLEY et al., 1996; DEJAGER et al., 2011). Porém, levando em conta o perfil plasmático inflamatório, a comparação dos nossos dados com outros trabalhos, evidencia certa similaridade demonstrando que, apesar das variações na taxa de mortalidade, o modelo é reprodutível em relação ao quadro inflamatório periférico inerente à sepse (WU et al., 2007; DA COSTA et al., 2017a; DA SILVA et al., 2017).

Relacionando a taxa de sobrevivência com o tratamento com DS-17, observa-se um possível efeito benéfico deste composto, já que o grupo de animais sépticos tratados com DS-17 não apresentou mortes dentro do período de 24h, contra uma taxa de quase 28% de mortalidade para o grupo séptico que não recebeu DS-17, apesar de tal efeito não ter sido estatisticamente significativo. De maneira semelhante Da Silva et al. (2017), também observaram que a administração de DS-17 na mesma concentração utilizada neste estudo, reduziu a taxa de mortalidade nas primeiras 24 horas após CLP. Apesar disso, o efeito mostrou-se passageiro, visto que o monitoramento de mortalidade se estendeu por mais 24 horas e, neste período, os animais tratados com DS-17 voltaram a apresentar mortalidade semelhante ao grupo não tratado. Ainda é importante observar que os níveis plasmáticos de curcumina, avaliados por HPLC, apresentaram queda significativa após 6 horas da administração e não detectáveis após 24 horas (DA SILVA et al., 2017). Vale ressaltar que os autores realizaram um pré-tratamento dos ratos com a dispersão da curcumina uma semana antes e um tratamento 2 horas após a cirurgia. Além disso, foram realizados 10 furos no ceco, o que induziu provavelmente uma sepse mais intensa que a deste estudo. É provável que a adoção de um protocolo de tratamento por um período mais longo em substituição à administração única, possa ter um efeito mais benéfico na taxa de sobrevivência dos animais em ambos estudos.

No contexto da sepse, a capacidade do organismo em manter padrões hemodinâmicos e a correta perfusão tecidual é uma condição de fundamental importância, visto que grande parte da gravidade do quadro clínico da sepse se deve a perturbações dos mecanismos de controle dos fluidos corporais e hipotensão persistente (TAVERNIER et al., 1998; TAKAKURA et al., 2002; ANDREWS et al., 2017; SANTOS-JUNIOR et al., 2018). Neste sentido, a secreção de vasopressina e ocitocina assume papel indispensável, já que ambas contribuem para a preservação dos parâmetros hemodinâmicos (MCCANN et al., 2002; ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004), além de inibirem a inflamação (IŞERI et al., 2005; ZHAO; BRINTON, 2004; DA COSTA, 2020).

Estudos demonstram que nos estágios iniciais da sepse, a secreção de AVP e OT aumentam significativamente retrocedendo para os níveis basais durante a fase tardia. A resposta inicial de secreção de OT e AVP é benéfica, tanto para a manutenção das condições hemodinâmicas, como para a inibição da inflamação. Já a retomada dos níveis basais constitui uma resposta mal adaptativa com intensos prejuízos para

o hospedeiro (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009; WAHAB et al., 2015; DA COSTA, 2020). O comprometimento da função endócrina na fase tardia da sepse pode ser provocado, entre outros fatores, por estresse oxidativo, excesso de mediadores inflamatórios e morte celular (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN; BASSO; ROCHA, 2014; WAHAB et al., 2015; DA COSTA et al., 2017a). Assim, qualquer terapia que minimize tais impactos na atividade endócrina hipotalâmica traria resultados benéficos no desenvolvimento da sepse.

Em nossos resultados observamos que 24 horas após o procedimento cirúrgico, os níveis plasmáticos de OT e AVP foram semelhantes para animais sépticos e seus controles, o que reproduz as observações de trabalhos anteriores relatando a secreção basal de AVP e OT na fase tardia da sepse (OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R. et al., 2009; WAHAB et al., 2015). Além disso, avaliamos os efeitos da administração de DS-17 na secreção dos hormônios hipotalâmicos durante a fase tardia da sepse. Animais sépticos tratados com DS-17 apresentaram os mesmos níveis plasmáticos de OT e AVP de animais não tratados, descartando um efeito desse composto na secreção desses hormônios na fase tardia da sepse.

Para investigar o impacto da DS-17 em processos apoptóticos, realizamos a quantificação de proteínas específicas no hipotálamo dos animais sépticos e seus controles. Uma das moléculas investigadas no tecido hipotalâmico foi a Bcl-2, proteína com papel anti-apoptótico exercido por meio da preservação da permeabilidade da membrana mitocondrial. Ação esta que impede a liberação de citocromo-c no citoplasma e o desencadeamento da cascata de apoptose (KIM, 2005; GU; MEI; ZHAO, 2020;). Em nossos experimentos, ratos sépticos não apresentaram alterações dos níveis hipotalâmicos de Bcl-2 em comparação com animais controles. Além disso, o tratamento com DS-17 também não alterou sua expressão. Estes achados foram diferentes do esperado, visto que a neuroinflamação característica da sepse está associada à apoptose de neurônios hipotalâmicos, o que seria um dos fatores responsáveis pelo comprometimento da secreção de OT e AVP (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2013; DA COSTA et al., 2017b).

Neste contexto, Da Costa et al. (2017a,b) usando o modelo de CLP com 10 furos, demonstraram uma ligeira redução dos níveis de Bcl-2 após 24 horas da indução da sepse, encontrando também alterações proeminentes nos níveis de outra proteína a Bcl-xL, uma proteína anti-apoptótica, que inibe a permeabilidade mitocondrial de maneira mais potente que a Bcl-2. esses mesmos estudos consideraram que a

apoptose no tecido hipotalâmico desencadeada pela sepse está mais relacionada a reduções dos níveis de Bcl-xL do que Bcl-2. O que possibilitaria acharmos essa diferença se em nosso trabalho caso tivéssemos optado por analisar o Bcl-xL ao invés de Bcl-2.

Deste modo, é possível que pelo fato de a Bcl-2 estar menos envolvida no processo descrito, suas alterações sejam mais sutis e difíceis de detectar, o que, em nossos experimentos inviabilizou a detecção de alterações na expressão e investigação dos efeitos da curcumina já que o modelo de dois furos que empregamos neste estudo, deve ter induzido uma sepse menos grave do que a vista pelos pesquisadores, desencadeando uma menor ativação de vias de morte celular hipotalâmica.

Outro marcador de apoptose investigado é a poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) clivada. A PARP-1 possui diversas funções celulares, tanto fisiológicas como patológicas. Considerando que o processo apoptótico é marcado pela clivagem de diversas proteínas essenciais para a sobrevivência e viabilidade celular, durante a apoptose, PARP-1 é intensamente clivada pela ação de caspases. Assim, a clivagem desta enzima é empregada como marcador de apoptose (SOLDANI; SCOVASSI, 2002; CHAITANYA; ALEXANDER; BABU, 2010).

Esperávamos que em ratos sépticos os níveis de PARP-1 clivada estivessem aumentados, como descrito no estudo de Da Costa (2020) através do qual poderíamos avaliar os efeitos da curcumina na apoptose de células hipotalâmicas. Contudo, no presente trabalho os animais sépticos ou OF apresentaram níveis semelhantes de PARP-1 clivada e a administração de DS-17 não modificou tais níveis. Estes achados somados aos resultados da expressão de Bcl-2 sugerem mais uma vez que, a neuroinflamação e a consequente apoptose hipotalâmica ocorreram de maneira branda ou inexistiram em nossos animais. Adicionalmente, devemos lembrar que a clivagem de PARP é um dos mecanismos finais do processo de apoptose, assim podemos supor que talvez encontraríamos apenas um aumento na expressão dessa proteína em períodos mais tardios que o observado por nós.

Adicionalmente, também avaliamos os níveis de sinaptofisina. Esta proteína está presente na membrana de vesículas sinápticas responsáveis pelo estoque de neurotransmissores. Deste modo, sua expressão está associada a densidade sináptica. Com base neste princípio, decréscimos nos níveis de sinaptofisina podem estar associados a reduções na densidade sináptica decorrente de processos

deletérios no SNC, como dano neuronal (SCHWALM et al., 2014). Por outro lado, aumentos nos níveis de sinaptofisina podem indicar uma resposta adaptativa de maior atividade sináptica (VALTORTA et al., 2004). Estudos do nosso laboratório mostraram que após 6 horas da indução da sepse, a expressão de sinaptofisina no hipotálamo aumenta significativamente, acompanhando os acréscimos na secreção de OT e AVP. No entanto, após 24 horas a expressão desta proteína retorna aos níveis basais (DA COSTA et al., 2020). Estes dados sugerem que na fase inicial da sepse há aumento da atividade sináptica hipotalâmica na tentativa de preservar as funções orgânicas controladas por esta região e, com a progressão do quadro, o incremento da atividade sofre estagnação, que é compatível com a retomada dos níveis basais de OT e AVP (DA COSTA, 2020).

Frente a estas observações, quantificamos a expressão de sinaptofisina em ratos tratados com DS-17 com a finalidade de avaliar um possível efeito protetor da curcumina sobre a atividade hipotalâmica, o qual poderia contribuir para a preservação da resposta compensatória hipotalâmica e menores prejuízos orgânicos. Assim como em estudos anteriores, observamos que após 24 horas da indução da sepse a expressão de sinaptofisina se mantém em níveis basais. Contudo, não detectamos qualquer efeito da curcumina sobre a expressão dessa proteína.

Concomitantemente investigamos as moléculas envolvidas com a sinalização da resposta inflamatória no hipotálamo. Inicialmente, quantificamos a expressão de NF- κ B, fator de transcrição essencial para a ativação de células inflamatórias, bem como para a expressão de centenas de genes de mediadores inflamatórios, como citocinas (ABRAHAM, 2003; SERASANAMBATI; CHILAKAPATI, 2016). Nossos resultados indicaram que após 24 horas da indução da sepse, animais sépticos tratados ou não com DS-17 apresentaram os mesmos níveis de expressão de NF- κ B dos seus controles. De fato, este resultado gerou surpresa, já que esperávamos que nossos animais submetidos à CLP apresentassem neuroinflamação significativa devido ao quadro séptico.

Adicionalmente, estudos demonstram que a curcumina exerce parte de seus efeitos anti-inflamatórios justamente por inibição direta da ativação do NF- κ B, impedindo a fosforilação e degradação da I κ B e a consequente translocação do NF- κ B para o núcleo celular (SINGH; AGGARWAL, 1995; POYLIN et al., 2008; SERASANAMBATI; CHILAKAPATI, 2016). Deste modo, nos animais sépticos tratados

com DS-17 esperávamos algum efeito da curcumina na expressão desta proteína. O que não aconteceu.

Os níveis da expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) também foram avaliados. Em situações normais, a expressão basal dessa enzima é bastante reduzida. No entanto, sua transcrição é fortemente estimulada na presença dos mais variados estímulos inflamatórios de maneira rápida. No SNC, as células da glia são as grandes responsáveis pela expressão de iNOS e, conseqüentemente, síntese de óxido nítrico no cérebro (WONG et al., 1996; GHASEMI; FATEMI, 2014). Apesar de o NO possuir ação neuromoduladora e neurotransmissora, além de ação microbicida por seu caráter de radical livre, excessos estão relacionados a prejuízos (WAHAB et al., 2015). Nesse âmbito, o próprio comprometimento da secreção de hormônios hipotalâmicos durante a sepse é atribuído, em partes, à produção central excessiva de NO (GIUSTI-PAIVA; KAGOHARA ELIAS; ANTUNES-RODRIGUES, 2005; CORREA et al., 2007; GHASEMI; FATEMI, 2014; WAHAB et al., 2015). No presente trabalho não encontramos alterações na expressão de iNOS no tecido hipotalâmico de ratos submetidos à CLP. Ressaltamos, porém, que a ausência de alterações desses marcadores não implica a inexistência de mecanismos neuroinflamatórios em nosso modelo, uma vez que existe uma miríade de mediadores inflamatórios que não foram avaliados, além de uma diferente expressão temporal desses mediadores. Acreditamos que no presente trabalho é possível que os animais tenham desenvolvido um quadro de sepse mais branda, o que gerou padrões de respostas inflamatórias mais amenas, inviabilizando a avaliação de certos efeitos da curcumina. Uma avaliação mais abrangente de outros marcadores e em diferentes estágios da sepse seria relevante para melhor avaliação da neuroinflamação hipotalâmica.

Além de indicadores relativos à apoptose e à neuroinflamação, também dosamos os níveis plasmáticos de algumas citocinas encontradas na sepse. TNF- α e IL1- β são as citocinas de maior relevância no estabelecimento da inflamação e, conseqüentemente na fisiopatologia da sepse. Ambas são produzidas rapidamente após os primeiros sinais de injúria e infecção, e levam a ativação maciça de células imunes bem como à liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios. Em nossos resultados animais submetidos à CLP apresentaram níveis plasmáticos elevados de IL1- β em relação aos seus controles, resultado compatível com outros trabalhos (WAHAB et al., 2015; DA SILVA et al., 2017; DA COSTA, 2020). A

administração de DS-17 foi capaz de atenuar os níveis plasmáticos de IL1- β , apesar de não reverter completamente o aumento causado pela indução séptica por CLP.

Por outro lado, em nenhum dos grupos foram detectados níveis de TNF- α . Como já foi demonstrado em outros trabalhos utilizando o CLP, essa citocina tem seus níveis plasmáticos aumentados somente nas primeiras horas após o estímulo séptico e logo retorna aos níveis do controle (WAHAB et al., 2013; OLIVEIRA-PELLEGRIN et al., 2013b; DA COSTA et al., 2017a), não sendo detectado em estágios mais tardios da doença (SANTOS JUNIOR, 2018; CATALÃO et al., 2020).

A dosagem plasmática de IL-6 também demonstrou que 24 horas após a indução séptica, as concentrações desta citocina aumentaram significativamente em relação aos controles. Este resultado era esperado já que a IL-6 é um mediador importante na resposta de fase aguda contra infecções sendo responsável pela indução da febre, leucocitose e a liberação de proteínas de fase aguda hepáticas como a proteína C reativa, componentes do complemento e fibrinogênio (KUSHNER; RZEWNICKI, 1994; SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013). Com a progressão do quadro séptico é normal observarmos uma redução dos níveis circulantes de IL-6 em relação a períodos mais iniciais, justamente por seu caráter de fase aguda. Contudo, mesmo após 24 horas seus níveis se mantiveram superiores aos dos animais controles. Resultados semelhantes a estes também foram observados em outros trabalhos do nosso laboratório (SANTOS-JUNIOR et al., 2018; DA COSTA, 2020).

De maneira interessante, a administração de DS-17 foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de IL-6 marcadamente, resultado compatível com trabalhos anteriores (DA SILVA et al., 2017; KARIMI et al., 2019).

Os níveis plasmáticos de citocina pró-inflamatórias como IL1- β e IL-6 são fortemente correlacionados com a severidade e a taxa de mortalidade da sepse (BOZZA et al., 2007; SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013). Deste modo, os efeitos da curcumina sobre os níveis destas citocinas sugerem um efeito anti-inflamatório terapêutico promissor

Conforme já descrito na introdução, estudos demonstram que a ação anti-inflamatória de amplo espectro da curcumina se deve à sua capacidade de regular a ação de dois fatores de transcrição com papel central sobre a expressão de mediadores inflamatórios: NF- κ B e os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs). A ação da curcumina sobre o NF- κ B foi abordada

anteriormente, já os PPARs são receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição regulados por ligantes. Os PPARs controlam a expressão gênica se ligando a regiões específicas dos promotores. Tais receptores podem aumentar a expressão de certos genes e inibir a expressão de outros. Dentre as três isoformas de PPARs, atribui-se ao PPAR γ forte ação anti-inflamatória.

Estudos demonstram que esta ação se deve a uma inibição da atividade do NF- κ B e outros fatores de transcrição que controlam a expressão de genes inflamatórios (RICOTE et al., 1998; BERGER; MOLLER, 2002; VICTOR et al., 2006). Assim, a ativação de PPAR γ reduz a produção de citocinas dependentes de NF- κ B, ou seja, além de inibir diretamente o NF- κ B, a curcumina promove a expressão e ativação de PPAR γ , o que maximiza a inibição sobre o NF- κ B. Deste modo, podemos sugerir estes mecanismos como os responsáveis pelos efeitos observados sobre os níveis de IL1- β e IL-6 em nosso trabalho (SHISHODIA; SINGH; CHATURVEDI, 2007). Entretanto nós analisamos NF- κ B somente no hipotálamo.

Por fim, dosamos os níveis plasmáticos de IL-10. Ratos submetidos à CLP apresentaram aumentos nos níveis desta citocina, algo que também era esperado, visto que a mesma é intensamente liberada durante quadros infecciosos/inflamatórios e possui função anti-inflamatória, controlando, por exemplo, os níveis de IL1- β e TNF- α , sendo assim, fundamental para a regulação da resposta do hospedeiro (GABRYŠOVÁ et al., 2014). Além disso, liberação desta citocina em determinados momentos do curso da sepse é fundamental para uma evolução positiva e reversão do choque (SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013). Em nossos resultados, entretanto, não observamos efeitos da curcumina sobre os níveis plasmáticos de IL-10.

A ausência de efeitos da curcumina sobre os níveis de IL-10 pode ser devida ao fato de que a expressão desta citocina é controlada por vários outros fatores de transcrição além do NF- κ B, como ERK, mTOR e GSK3- β . Assim, mesmo com os efeitos inibitórios da curcumina sobre o NF- κ B, outros estímulos transcricionais garantem sua expressão; podendo ser o fato pelo qual animais tratados com DS-17 apresentaram níveis de IL1- β e IL-6 menores que animais não tratados mas ainda superiores aos animais da operação fictícia (GABRYŠOVÁ et al., 2014).

Neste contexto, trabalhos demonstram que o diâmetro da agulha usada na CLP, a quantidade de material fecal extravasada, bem como o espectro bacteriano podem

influenciar fortemente características da resposta inflamatória, como níveis de citocinas, tempo de evolução do quadro, gravidade e mortalidade (DEJAGER et al., 2011; VILLA et al., 1995; WALLEY et al., 1996), o que pode ter feito diferença nos resultados desse trabalho comparados aos da literatura.

6 CONCLUSÃO

Mediante os resultados encontrados podemos concluir que a DS-17, na dosagem de 100 mg/Kg administrada via oral em ratos da linhagem Wistar Hannover cuja sepse foi induzida por CLP 2 furos, promoveu um efeito anti-inflamatório periférico detectado no plasma de animais sépticos, entretanto aparentemente nenhum efeito na neuroinflamação do hipotálamo.

Sugere-se a realização de outros estudos que observem o efeito neuroprotetor e antioxidante da curcumina com diferentes modelos de indução de sepse e/ou protocolos experimentais.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. [s.l: s.n.].
- ABRAHAM, E. Nuclear Factor- κ B and Its Role in Sepsis-Associated Organ Failure. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. s2, p. S364–S369, 15 jun. 2003.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. **Toll-like receptor signalling** *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , 2004. Disponível em: <www.nature.com/reviews/immunol>. Acesso em: 2 mar. 2021
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. **Pathogen recognition and innate immunity** *Cell* Cell Press, , 24 fev. 2006.
- ANDREWS, B. et al. Effect of an early resuscitation protocol on in-hospital mortality among adults with sepsis and hypotension: A randomized clinical trial. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 318, n. 13, p. 1233–1240, 3 out. 2017.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 169–208, 2004.
- ATHAYDE, L. A. **Participação dos leucotrienos na secreção de vasopressina durante a sepse experimental**. 2007. 109 folhas. Dissertação (Mestrado em Biociências aplicadas a Farmácia - Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Ribeirão Preto) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- BERGER, J.; MOLLER, D. E. the Mechanisms of Action of Ppars. **Annual Review of Medicine Vol. 53:409-435 (Volume publication date February 2002)**, 2002.
- BOWLER, P. G. Wound pathophysiology, infection and therapeutic options. **Annals of Medicine**, v. 34, n. 6, p. 419–427, 2002.
- BOZZA, F. A. et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: A multiplex analysis. **Critical Care**, v. 11, n. 2, p. 1–8, 21 abr. 2007.
- BRINKMANN, V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. **Journal of Innate Immunity**, v. 10, n. 5–6, p. 414–421, 1 dez. 2018.
- BRUNN, G. J.; PLATT, J. L. The etiology of sepsis: Turned inside out. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 10–16, 2006.
- BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 10, p. 854-65, Oct 2005. ISSN 1474-1776. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16224456>>.
- CARL NATHAN. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. December, p.

846–852, 2002.

CHAITANYA, G. V.; ALEXANDER, J. S.; BABU, P. P. PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. **Cell Communication and Signaling**, v. 8, p. 1–11, 2010.

CHAN, J. K. et al. **Alarmins: Awaiting a clinical response** *Journal of Clinical Investigation* American Society for Clinical Investigation, , 1 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.jci.org>>. Acesso em: 15 mar. 2021

CHIARUGI, A.; MOSKOWITZ, M. A. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF- κ B-driven transcription and microglial activation: Implication for neurodegenerative disorders. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, n. 2, p. 306–317, 1 abr. 2003.

CHUN, K. et al. Sepsis Pathogen Identification. **Journal of Laboratory Automation**, v. 20, n. 5, p. 539–561, 2015.

COOKSEY, C. J. Turmeric: old spice, new spice. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 92, n. 5, p. 309–314, 4 jul. 2017.

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

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

DA COSTA, L. H. A. **Participação da ativação microglial nas alterações endócrinas , neurológicas e imunes durante a sepse Participação da ativação microglial nas alterações endócrinas , neurológicas e imunes durante a sepse.** [s.l.] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE, 2020.

DA SILVA, L. S. et al. Curcumin suppresses inflammatory cytokines and heat shock protein 70 release and improves metabolic parameters during experimental sepsis. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 269–276, 2017.

DANIELSKI, L. G. et al. Brain Barrier Breakdown as a Cause and Consequence of Neuroinflammation in Sepsis. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 1045–1053, 2018.

DARWISH, I.; CONRAD LILES, W. **Emerging therapeutic strategies to prevent infection-related microvascular endothelial activation and dysfunction** *Virulence* Taylor and Francis Inc., , 2013. Disponível em:

</pmc/articles/PMC5359747/>. Acesso em: 22 mar. 2021

DEJAGER, L. et al. **Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis?** *Trends in Microbiology* Elsevier Current Trends, , 1 abr. 2011.

DENNING, N. L. et al. Damps and nets in sepsis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. OCT, p. 1–15, 2019.

DEUTSCHMAN, C. S.; TRACEY, K. J. **Sepsis: Current dogma and new perspectives** *Immunity* Cell Press, , 17 abr. 2014.

DOERSCHUG, K. C. et al. Impairments in microvascular reactivity are related to organ failure in human sepsis. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 2, p. 1065–1071, ago. 2007.

DORLAND, W. A. NEWMAN; ZIMENKOV'S'KYI, BORYS; DZUL, P. **Dorland's Illustrated Medical Dictionary - 32nd Edition**. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/books/dorlands-illustrated-medical-dictionary/dorland/978-1-4160-6257-8>>. Acesso em: 28 fev. 2021.

DREXLER, M. **What You Need to Know About Infectious Disease**. [s.l.: s.n.].

FAVARETTO, L.; PRETO, T. R. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO Secreção de vasopressina e ocitocina após estímulo osmótico e hipovolêmico em animais sobreviventes à sepse. 2014.

GABRYŠOVÁ, L. et al. The regulation of IL-10 expression. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 380, p. 157–190, 2014.

GARRIDO, A. G.; FIGUEIREDO, L. F. P. DE; SILVA, M. R. E. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 82–88, abr. 2004.

GENTILE, L. F.; MOLDAWER, L. L. **DAMPs, PAMPs, and the origins of SIRS in bacterial sepsis** *Shock* NIH Public Access, , jan. 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC3767300/>. Acesso em: 15 mar. 2021

GHASEMI, F. et al. Effects of Curcumin on Microglial Cells. **Neurotoxicity Research**, v. 36, n. 1, p. 12–26, 2019.

GHASEMI, M.; FATEMI, A. **Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* Elsevier Ltd, , 1 set. 2014.

GIUSTI-PAIVA, A.; KAGOHARA ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Inhibitory

- effect of gaseous neuromodulators in vasopressin and oxytocin release induced by endotoxin in rats. **Neuroscience Letters**, v. 381, n. 3, p. 320–324, 24 jun. 2005.
- GU, M.; MEI, X. L.; ZHAO, Y. N. Sepsis and Cerebral Dysfunction: BBB Damage, Neuroinflammation, Oxidative Stress, Apoptosis and Autophagy as Key Mediators and the Potential Therapeutic Approaches. **Neurotoxicity Research**, p. 489–503, 2020.
- GUALTIEROTTI, R. et al. Modulation of Neuroinflammation in the Central Nervous System: Role of Chemokines and Sphingolipids. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 2, p. 396–420, 2017.
- GUO, R.-F.; WARD, P. A. ROLE OF C5A IN INFLAMMATORY RESPONSES. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 821–852, 27 abr. 2005.
- HALL, J. E. **Guyton e Hall Tratado de Fisiologia Médica**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2017.
- HOESEL, B.; SCHMID, J. A. **The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer****Molecular Cancer**BioMed Central, , 2 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.molecular-cancer.com/content/12/1/86>>. Acesso em: 22 mar. 2021
- IŞERI, S. Ö. et al. Oxytocin protects against sepsis-induced multiple organ damage: Role of neutrophils. **Journal of Surgical Research**, v. 126, n. 1, p. 73–81, 2005.
- IWASHYNA, T. J. et al. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 304, n. 16, p. 1787–1794, 2010.
- KAPLAN, M. J.; RADIC, M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2689–2695, 15 set. 2012.
- KARIMI, A. et al. Therapeutic effects of curcumin on sepsis and mechanisms of action: A systematic review of preclinical studies. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 11, p. 2798–2820, 2019.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. 2010.
- KIM, R. **Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death****Biochemical and Biophysical Research Communications**Academic Press Inc., , 29 jul. 2005.
- KRAUS, W. L.; LIS, J. T. **PARP goes transcription****Cell**Elsevier B.V., , 13 jun. 2003.
- KUSHNER, I.; RZEWNICKI, D. L. The acute phase response: General aspects. **Bailliere's Clinical Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 513–530, 1 ago. 1994.
- LAWEN, A. Apoptosis - An introduction. **BioEssays**, v. 25, n. 9, p. 888–896, 2003.

- LEVI, M.; VAN DER POLL, T. **Coagulation and sepsis** *Thrombosis Research* Elsevier Ltd, , 1 jan. 2017.
- LEVY, M. M. et al. **2011 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference**. *Intensive Care Medicine*. **Anais...** Springer Verlag, 1 abr. 2003 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12664219/>>. Acesso em: 25 fev. 2021
- LI, R. H. L.; TABLIN, F. **A comparative review of neutrophil extracellular traps in sepsis** *Frontiers in Veterinary Science* Frontiers Media S.A., , 28 nov. 2018. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 15 mar. 2021
- LIN, G. L. et al. Epidemiology and Immune Pathogenesis of Viral Sepsis. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. September, p. 2147, 2018.
- MARKIEWSKI, M. M.; DEANGELIS, R. A.; LAMBRIS, J. D. Complexity of complement activation in sepsis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2245–2254, 1 dez. 2008.
- MARKWART, R. et al. Epidemiology and burden of sepsis acquired in hospitals and intensive care units: a systematic review and meta-analysis. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 8, p. 1536–1551, 2020.
- MARTIN, G. S. et al. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1546–1554, 2003.
- MARTINOD, K.; WAGNER, D. D. Thrombosis: Tangled up in NETs. **Blood**, v. 123, n. 18, p. 2768–2776, 1 maio 2014.
- MCCANN, S. M. et al. Oxytocin, vasopressin and atrial natriuretic peptide control body fluid homeostasis by action on their receptors in brain, cardiovascular system and kidney. **Progress in Brain Research**, v. 139, p. 309–328, 2002.
- MENESES, G. et al. Sepsis: Developing new alternatives to reduce neuroinflammation and attenuate brain injury. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1437, n. 1, p. 43–56, 2019.
- MIKACENIC, C. et al. Biomarkers of endothelial activation are associated with poor outcome in critical illness. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 22 out. 2015.
- MILOBEDESKA, J.; KOSTANECKI, V.; LAMPE, V. **Structure of curcumin** *Ber Dtsch Chem Ges*, , 1910.
- NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871–882, 2010.
- OLABISI, O. A. et al. Regulation of Transcription Factor NFAT by ADP-Ribosylation.

Molecular and Cellular Biology, v. 28, n. 9, p. 2860–2871, maio 2008.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R. et al. Thermoregulation and vasopressin secretion during polymicrobial sepsis. **NeuroImmunoModulation**, v. 16, n. 1, p. 45–53, 2009.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R. et al. Cleaved caspase-3 expression in hypothalamic magnocellular neurons may affect vasopressin secretion during experimental polymicrobial sepsis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 258, n. 1–2, p. 10–16, 15 maio 2013.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; BASSO, P. J.; ROCHA, M. J. A. Cellular bioenergetics changes in magnocellular neurons may affect copeptin expression in the late phase of sepsis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 267, n. 1–2, p. 28–34, 2014.

PHULWANI, N. K.; KIELIAN, T. Poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs) 1-3 regulate astrocyte activation. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, n. 2, p. 578–590, 1 jul. 2008.

PORTER, A. G.; JÄNICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, n. 2, p. 99–104, 1999.

POYLIN, V. et al. The NF- κ B inhibitor curcumin blocks sepsis-induced muscle proteolysis. **Mediators of Inflammation**, v. 2008, 2008.

PUGNER, K. M. et al. The costs of rheumatoid arthritis: An international long-term view. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 29, n. 5, p. 305–320, 2000.

RANG H.P., D. M. M. Rang & Dale Farmacologia. 2007.

RICOTE, M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 79–82, 1998.

RUBARTELLI, A.; LOTZE, M. T. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 10, p. 429–436, 1 out. 2007.

RUDD, K. E. et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 200–211, 2020.

RUSSELL, J. A. Management of Sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 16, p. 1699–1713, 19 out. 2006.

SANTOS-JUNIOR, N. N. et al. Alterations in hypothalamic synaptophysin and death markers may be associated with vasopressin impairment in sepsis survivor rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 30, n. 8, p. e12604, 1 ago. 2018.

SCHOUTEN, M. et al. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 3, p. 536–545, 1 mar. 2008.

- SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–16, 2013.
- 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. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 380–385, 2014.
- SERASANAMBATI, M.; CHILAKAPATI, S. R. Function of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) in Human Diseases-A Review. **South Indian Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 368, 2016.
- SHISHODIA, S.; SINGH, T.; CHATURVEDI, M. M. Modulation of transcription factors by curcumin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 595, p. 127–148, 2007.
- SILASI-MANSAT, R. et al. Complement inhibition decreases the procoagulant response and confers organ protection in a baboon model of Escherichia coli sepsis. **Blood**, v. 116, n. 6, p. 1002–1010, 12 ago. 2010.
- SIMBULAN-ROSENTHAL, C. M. et al. PARP-1 binds E2F-1 independently of its DNA binding and catalytic domains, and acts as a novel coactivator of E2F-1-mediated transcription during re-entry of quiescent cells into S phase. **Oncogene**, v. 22, n. 52, p. 8460–8471, 20 nov. 2003.
- SINGER, M. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 801–810, 2016.
- SINGH, S.; AGGARWAL, B. B. Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferulolylmethane). **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 24995–25000, 1995.
- SOLDANI, C.; SCOVASSI, A. I. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis : An update Cell death mechanisms : Necrosis and apoptosis. **Apoptosis**, v. 7, n. 4, p. 321–328, 2002.
- TABAH, A. et al. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: The EUROBACT International Cohort Study. **Intensive Care Medicine**, v. 38, n. 12, p. 1930–1945, 2012.
- TAKAKURA, K. et al. Modification of α 1-adrenoceptors by peroxynitrite as a possible mechanism of systemic hypotension in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 4, p. 894–899, 2002.

- TAVERNIER, B. et al. Systolic pressure variation as a guide to fluid therapy in patients with sepsis-induced hypotension. **Anesthesiology**, v. 89, n. 6, p. 1313–1321, 1 dez. 1998.
- TEIXEIRA, C. C. C. (2009). **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápico a partir de rizomas de Curcuma longa L. e avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral**. Medicamentos e Cosméticos, Riberão Preto, Universidade de São Paulo: 164.
- THOMSON, P. D.; SMITH, D. J. What is infection? **The American Journal of Surgery**, v. 167, n. 1 SUPPL., p. 7–11, 1994.
- VALTORTA, F. et al. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? **BioEssays**, v. 26, n. 4, p. 445–453, 1 abr. 2004.
- VAN DER POLL, T. et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 7, p. 407–420, 2017.
- VENET, F.; MONNERET, G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 2, p. 121–137, 2018a.
- VENET, F.; MONNERET, G. **Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression** *Nature Reviews Nephrology* Nature Publishing Group, , 1 fev. 2018b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29225343/>>. Acesso em: 22 mar. 2021
- VICTOR, N. A. et al. Altered PPAR γ expression and activation after transient focal ischemia in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 6, p. 1653–1663, 2006.
- VILLA, P. et al. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 2, n. 5, p. 549–553, 1995.
- VON BRÜHL, M. L. et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 4, p. 819–835, 9 abr. 2012.
- 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. 215–221, 2015.
- WALLEY, K. R. et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 11, p. 4733–4738, 1996.

WONG, M.-L. et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. **Nature Medicine**, v. 2, n. 5, p. 581–584, 1 maio 1996.

WU, R. et al. Ghrelin attenuates sepsis-induced acute lung injury and mortality in rats. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 176, n. 8, p. 805–813, 15 out. 2007.

YU, J. Y.; KIM, J. A.; JOUNG, H. J.; KO, J. A.; PARK, H. J. Preparation and characterization of curcumin solid dispersion using HPMC. **Journal of food science**, v.85, n.11, p.3866–3873, 2020.

ZHAO, L.; BRINTON, R. D. Suppression of Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α in Astrocytes by a V1 Vasopressin Receptor Agonist: A cAMP Response Element-Binding Protein-Dependent Mechanism. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 9, p. 2226–2235, 3 mar. 2004.

ZINGARELLI, B. et al. Absence of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Alters Nuclear Factor- κ B Activation and Gene Expression of Apoptosis Regulators after Reperfusion Injury. **Molecular Medicine**, v. 9, n. 5–8, p. 143–153, 30 jun. 2003.

ANEXO 1 - CEUA

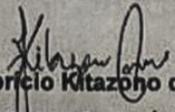
CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
--	---

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “**Neuroinflamação na sepse experimental e os efeitos da curcumina**”, Protocolo nº 2018.1.403.58.4, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 13/06/2018.

Vigência do Projeto	13/06/2018 a 13/06/2020
Espécie/Linhagem	Rato heterogêneo / Wistar Hannover
Nº de animais	120
Peso/Idade	250-300 g/ 2 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 13 de junho de 2018.


Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 060/2018

Ribeirão Preto, 13 de junho de 2018.

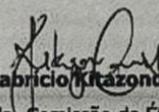
Ref. processo nº 2018.1.403.58.4

Senhor(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais, em sua 58ª Sessão, realizada em 13/06/2018, **APROVOU** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "Neuroinflamação na sepse experimental e os efeitos da curcumina" emitindo o certificado anexo.

Informamos, também, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, até **13/07/2020**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Fabricio Itazono de Carvalho

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo(a). Sr.(a)

Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha

Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica
desta Faculdade

ANEXO 2

Tabela 1 - Efeitos da administração oral de DS-17 (100 mg/kg) sobre a sobrevivência de animais submetidos a sepse.

	OF+H₂O	OF+DS-17	CLP+H₂O	CLP+DS-17
Animais vivos	6	6	10	14
Animais mortos	0	0	4	0
Número de animais	6	6	14	14

n representado na figura 3

Fonte: Próprio autor

Tabela 2 - Efeitos da administração oral de DS-17 (100 mg/kg) sobre a produção de Bcl-2

	OF+H₂O	OF+DS-17	CLP+H₂O	CLP+DS-17
	100	75,589	95,518	69,125
	100	98,005	69,015	74,790
	100	88,698	78,837	69,040
		113,195	100,555	94,776
		67,766	63,560	73,130
			101,971	90,806
				88,522
M	100	88,650	84,910	80,030
±	±	±	±	±
EPM	0	8,052	6,816	4,142
Número de animais	3	5	6	7
média (M), erro padrão da média (EPM), n representados na figura 4a				

Fonte: Próprio autor

Tabela 3 - Efeitos da administração oral de DS-17 (100 mg/kg) sobre a produção de NFκ-B.

	OF+H₂O	OF+DS-17	CLP+H₂O	CLP+DS-17
	100,00	123,028	99,594	97,652
	100,00	115,670	81,797	87,747
	100,00	61,193	54,497	75,265
		31,161	52,501	68,730
			61,427	65,0360
				100,550
M	100	82,760	69,960	82,500
±	±	±	±	±
EPM	0	22,050	9,042	6,137
Número de animais	3	4	5	6

média (M), erro padrão da média (EPM), n representados na figura 4b

Fonte: Próprio autor

Tabela 4 - Efeitos da administração oral de DS-17 (100 mg/kg) sobre a produção de iNOS.

	OF+H₂O	OF+DS-17	CLP+H₂O	CLP+DS-17
	100,00	63,690	62,068	141,916
	100,00	116,322	75,576	239,257
	100,00	100,892	121,158	127,653
	100,00	85,114	184,779	67,659
	100,00	218,059	66,864	84,994
		180,581	163,33	133,593
			85,966	425,286
			238,153	283,974
			202,117	50,690
				31,350
				314,480
				323,708
				456,618
M	100	127,440	133,300	206,200
±	±	±	±	±
EPM	0	24,300	21,890	39,840
Número de animais	5	6	9	13

média (M), erro padrão da média (EPM), n representados na figura 4c

Fonte: Próprio autor

Tabela 5 - Efeitos da administração oral de DS-17 (100 mg/kg) sobre a produção de sinaptofisina.

	OF+H₂O	OF+DS-17	CLP+H₂O	CLP+DS-17
	100,00	73,40	93,986	96,041
	100,00	99,586	98,223	87,397
	100,00	91,995	101,816	101,418
		85,746	101,387	89,112
		84,402		87,919
M	100	87,030	98,850	92,380
±	±	±	±	±
EPM	0	4,340	1,809	2,743
Número de animais	3	5	4	5

média (M), erro padrão da média (EPM), n representados na figura 4d

Fonte: Próprio autor

Tabela 6 - Efeitos da administração oral de DS-17 (100 mg/kg) sobre a produção de PARP clivada.

	OF+H₂O	OF+DS-17	CLP+H₂O	CLP+DS-17
	100,00	213,271	113,060	99,872
	100,00	12,0355	99,049	110,697
	100,00	167,729	104,860	151,932
	100,00	109,906	104,860	119,365
	100,00	121,635	116,895	57,049
		210,893	166,937	45,725
			138,975	
M	100	139,200	120,700	97,440
±	±	±	±	±
EPM	0	30,970	9,149	16,270
Número de animais	5	6	7	6

média (M), erro padrão da média (EPM), n representados na figura 4e

Fonte: Próprio autor

Tabela 7 - Efeitos da administração oral de DS-17 (100 mg/kg) sobre a produção de vasopressina.

	OF+H₂O	OF+DS-17	CLP+H₂O	CLP+DS-17
	9,304	4,10	1,574	4,10
	4,035	11,236	2,836	4,10
	13,289	2,197	4,10	12,74
	13,518	4,10	4,10	4,10
	20,656	4,10	4,10	3,459
	4,10	11,611	4,10	2,959
			4,10	4,10
			4,10	20,776
				17,442
				4,10
				11,179
				7,825
				4,10
				2,25
M	10,820	6,224	3,626	7,373
±	±	±	±	±
EPM	2,605	1,672	0,332	1,572
Número de animais	6	6	8	14

média (M), erro padrão da média (EPM), n representados na figura 5a

Fonte: Próprio autor

Tabela 8 - Efeitos da administração oral de DS-17 (100mg/kg) sobre a produção de ocitocina.

	OF+H₂O	OF+DS-17	CLP+H₂O	CLP+DS-17
	15,60	18,173	36,192	23,93
	40,771	26,655	29,731	36,766
	29,286	15,60	31,808	30,00
	15,60	22,351	27,611	39,484
	50,981	91,443	30,179	46,597
	15,178		28,225	33,836
			31,444	30,99
M	27,900	34,840	30,740	34,510
±	±	±	±	±
EPM	6,231	14,270	1,078	2,765
Número de animais	6	5	7	7

média (M), erro padrão da média (EPM), n representados na figura 5b

Fonte: Próprio autor

Tabela 9 - Efeitos da administração oral de DS-17 (100mg/kg) sobre a produção de IL-1 beta.

	OF+H₂O	OF+DS-17	CLP+H₂O	CLP+DS-17
	192,156	310,062	581,075	613,997
	165,811	187,526	615,729	461,146
	186,041	225,326	793,632	445,604
	234,919	204,134	644,205	492,926
	141,497		571,382	429,656
			631,700	
			752,028	
M	184,100	231,800	655,700	488,700
±	±	±	±	±
EPM	15,490	27,220	32,100	33,030
Número de animais	5	4	7	5

média (M), erro padrão da média (EPM), n representados na figura 6a

Fonte: Próprio autor

Tabela 10 - Efeitos da administração oral de DS-17 (100mg/kg) sobre a produção de IL-6.

	OF+H₂O	OF+DS-17	CLP+H₂O	CLP+DS-17
	68,240	100,879	114,928	211,759
	96,388	47,984	233,062	317,805
	124,954	15,600	251,433	128,132
	35,447	15,600	287,610	41,168
	15,600	0,855	150,215	63,922
	97,230	105,932	273,863	254,032
			441,587	35,271
			468,266	8,657
			139,044	286,577
			15,600	379,602
				15,600
				179,114
				72,303
				15,600
M	72,980	47,810	237,600	143,500
±	±	±	±	±
EPM	16,890	18,690	44,790	33,930
Número de animais	6	6	10	14

média (M), erro padrão da média (EPM), n representados na figura 6b

Fonte: Próprio autor

Tabela 11 - Efeitos da administração oral de DS-17 (100mg/kg) sobre a produção de IL-10.

	OF+H ₂ O	OF+DS-17	CLP+H ₂ O	CLP+DS-17
			472,094	464,266
			327,736	377,228
			475,033	381,333
			409,165	413,347
			423,071	
			421,400	409,000
M	±	±	±	±
±				
EPM			26,810	20,100
Número de animais			5	4

média (M), erro padrão da média (EPM), n representados na figura 6c

Fonte: Próprio autor