

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ROMULO GORONCI SANT'ANA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SEPSE SOBRE AS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E INFLAMATÓRIAS APÓS ESTIMULAÇÃO
DOPAMINÉRGICA EM RATOS**

CRICIÚMA

2024

ROMULO GORONCI SANT'ANA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SEPSE SOBRE AS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E INFLAMATÓRIAS APÓS ESTIMULAÇÃO
DOPAMINÉRGICA EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde

Orientadora: Prof. Dra. Samira da Silva Valvassori

CRICIÚMA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S232s Sant'Ana Romulo Goronci.

Avaliação dos efeitos da sepse sobre as respostas comportamentais e inflamatórias após estimulação dopaminérgica em ratos / Romulo Goronci Sant'Ana. - 2024.

56 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2024.

Orientação: Samira da Silva Valvassori.

1. Sepse. 2. citocinas. 3. Dopamina. 4. Fatores de crescimento neural. 5. Metanfetamina. I. Título.

CDD 23. ed. 616.944

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

PARECER

No dia 28 (vinte e oito) do mês de agosto de 2024, às 08 (oito) horas, na Sala 105/Bloco R1, após o cumprimento legal de conclusão das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado), realizaram-se a apresentação e a conseqüente defesa da tese intitulada: **“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SEPSE SOBRE AS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E INFLAMATÓRIAS APÓS ESTIMULAÇÃO DOPAMINÉRGICA EM RATOS”**, do candidato Romulo Goronci Sant’Ana. A Banca examinadora foi composta pelos(as) professores(as): Dra. Josiane Budni (Membro Relator – UNESC), Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Membro Interno – UNESC), Dr. Kristian Madeira (Membro Externo – UNESC) e Dra. Michelle Lima Garcez (Membro Externo – UFSC). Após a apresentação, o candidato foi arguido pela Banca Examinadora, que assim expressou o resultado final da tese:

Trabalho aprovado

Trabalho não aprovado

Observações:

Criciúma, SC, 28 de agosto de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **JOSIANE BUDNI**
Data: 13/09/2024 16:13:17-0300
Verifique em <https://validar.jb.gov.br>


Profa. Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Relator – UNESC

Documento assinado digitalmente
 **ALEXANDRA IOPPI ZUGNO**
Data: 13/09/2024 18:51:00-0300
Verifique em <https://validar.jb.gov.br>


Profa. Dra. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Membro Interno – UNESC

Documento assinado digitalmente
 **KRISTIAN MADEIRA**
Data: 12/09/2024 19:25:24-0300
Verifique em <https://validar.jb.gov.br>


Prof. Dr. KRISTIAN MADEIRA
Membro Externo – UNESC

Documento assinado digitalmente
 **MICHELLE LIMA GARCEZ**
Data: 12/09/2024 17:50:15-0300
Verifique em <https://validar.jb.gov.br>

Profa. Dra. MICHELLE LIMA GARCEZ
Membro Externo – UFSC

Documento assinado digitalmente
 **SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**
Data: 13/09/2024 19:28:00-0300
Verifique em <https://validar.jb.gov.br>

Profa. Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI
Orientador(a)

Documento assinado digitalmente
 **EMILIO LUIZ STRECK**
Data: 13/09/2024 19:00:00-0300
Verifique em <https://validar.jb.gov.br>

Prof. Dr. EMILIO LUIZ STRECK
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Psiquiatria Translacional do
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Dedico este trabalho ao meu filho, Lorenzo, por ser a razão do meu esforço e a fonte da minha alegria. Sua inocência e doçura me motivam a seguir em frente a cada dia. Que você cresça sempre cercado de amor e inspiração, e saiba que, a cada passo desta jornada, penso em como fazer do mundo um lugar melhor para você.

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese de doutorado não seria possível sem o apoio incondicional de muitas pessoas que, de diferentes maneiras, contribuíram para esta jornada.

Agradeço sinceramente aos meus pais, Maria Diomar e Israel, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a perseguir meus sonhos. Sua dedicação e amor foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À minha esposa, Tatiani, meu eterno agradecimento por sua paciência, compreensão e amor. Sua presença ao meu lado me deu forças nos momentos mais desafiadores e celebramos juntos cada pequena conquista. Você é uma parte essencial da minha vida e me motiva a ser a melhor versão de mim mesmo.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Ramon, pela torcida, pelo apoio e pela amizade que sempre estiveram presentes ao longo da minha jornada.

A minha orientadora, Profa. Dra. Samira Valvassori, expressei minha profunda gratidão pela orientação fundamental, por suas valiosas contribuições e pela confiança depositada em mim. A todos os alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado que contribuíram para realização desse estudo, muito obrigado pela colaboração.

Agradeço aos membros da banca avaliadora, Profa. Dra. Josiane Budni, Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno, Prof. Dr. Kristian Madeira e Profa. Dra. Michelle Lima Garcez, pela disposição em avaliar este trabalho e pelas valiosas críticas e sugestões que certamente enriquecerão minha pesquisa e minha formação.

Por fim, agradeço ao Centro Universitário do Espírito Santo pela oportunidade e pelo apoio inestimável ao meu aperfeiçoamento profissional.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar se a sepse sensibiliza o sistema dopaminérgico de forma que exacerbe os efeitos comportamentais e bioquímicos da m-AMPH. Para isso, ratos Wistar foram submetidos à ligadura e punção cecal (CLP). Após 30 dias do procedimento de CLP, os animais foram submetidos a uma única injeção intraperitoneal de solução salina ou m-AMPH (0,25, 0,50 ou 1,0mg/kg). O comportamento locomotor foi avaliado 2 horas após a administração da droga. Foram dosadas as Interleucinas (IL), IL-1 β , IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF)- α , fosfoproteína regulada por dopamina-cAMP de 32.000 kDa (DARPP-32) e níveis de sensor de cálcio neuronal (NCS-1) foram avaliados no córtex frontal, hipocampo e estriado. Além disso, os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), do fator de crescimento neuronal (NGF) e do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) foram avaliados no hipocampo. A m-AMPH isoladamente (0,25 e 1,0 mg/kg) aumentou a locomoção e o comportamento exploratório dos ratos em comparação com Sham+Sal. Os animais do grupo CLP + m-AMPH (0,5 e/ou 1,0 mg/kg) apresentaram aumento na locomoção, comportamento exploratório e de risco quando comparados ao grupo Sham+Salina e com seus respectivos grupos Sham. Nos grupos CLP houve aumento dos níveis das citocinas em comparação ao Sham+Sal. Entretanto, os animais com CLP que receberam m-AMPH (1mg/kg) aumentaram, ainda mais, esses parâmetros inflamatórios em comparação ao grupo Sham+Sal e ao grupo CLP + solução salina. A m-AMPH em doses mais baixas aumentou os fatores neurotróficos, mas doses mais altas diminuíram esses parâmetros no cérebro de ratos com CLP. A m-AMPH aumentou de forma dependente da dose os níveis de DARPP-32 e NCS-1 em ratos com ligadura e punção cecal em algumas estruturas. Em conclusão, estes resultados demonstram que a sepse sensibiliza as respostas dopaminérgicas comportamentais enquanto induz alterações nos níveis de neurotrofinas e citocinas em resposta à m-AMPH em um modelo de ligadura e punção cecal.

Palavras-chave: Sepse; CLP; Citocinas; Neurotrofinas; Dopamina; Metanfetamina

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate if sepsis sensitizes behavioral dopaminergic responses induced by m-amphetamine. For this, Wistar rats were submitted to the cecal ligation and puncture. After 30 days of cecal ligation and puncture procedure, the animals were submitted to a single intraperitoneal injection of saline or m-amphetamine (0.25, 0.50, or 1.0mg/kg). Locomotor behavior was assessed 2h after the administration. interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , dopamine-cAMP-regulated phosphoprotein of 32,000 kDa (DARPP-32) and neuronal calcium sensor (NCS-1) levels were evaluated in the frontal cortex, hippocampus, and striatum. Also, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neuronal growth factor (NGF) and glial derived neurotrophic factor (GDNF) levels were assessed in the hippocampus. M-amphetamine alone (0.25 and 1.0mg/kg) increased rats' locomotion and exploratory behavior compared to the Sham+Sal. Animals from the cecal ligation and puncture + m-amphetamine (0.5 and/or 1.0 mg/kg) group showed an increase in locomotion, exploratory and risk-like behavior when compared to the Sham+Saline group and with its respective Sham groups. cecal ligation and puncture increased interleukin levels compared to the Sham+Sal. However, cecal ligation and puncture animals that received m-amphetamine (1mg/kg) increased, even more, these inflammatory parameters compared to the Sham+Sal and the cecal ligation and puncture+ saline group. m-amphetamine at lower doses increased neurotrophic factors, but higher doses decreased these parameters in the brain of cecal ligation and puncture rats. m-amphetamine dose-dependently increased DARPP-32 and NCS-1 levels in cecal ligation and puncture rats in some structures. In conclusion, these results demonstrate that sepsis sensitizes behavioral dopaminergic responses while inducing inflammatory and neurotrophic vulnerability to m-amphetamine in a cecal ligation and puncture model.

Keywords: inflammation; cytokines; neurotrophic factor; dopamine; m-amphetamine

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

3-MT: 3-metoxitiramina

AAAD: descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE: barreira hemato-encefálica

CA: teste de campo aberto

CLP: ligadura e punção cecal

COMT: catecol metiltransferase

CREB: proteína de ligação responsiva ao AMPc

DA: dopamina

d-AMPH: dextroanfetamina

DARPP-32: fosfoproteína regulada por dopamina-cAMP de 32.000 kDa

DAT: transportador de DA

EAS: encefalopatia associada à sepse

ELISA: ensaio imunoenzimático

ERN: espécies reativas do nitrogênio

ERO: espécie reativa de oxigênio

GDNF: fator neurotrófico derivado da glia

HVA: ácido homovanílico

IGF-1: fator 1 de crescimento tipo insulina

IL: Interleucina

IP: intraperitoneal

L-DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina

LPS: lipopolissacarídeo

LT: leucotrienos

m-AMPH: metanfetamina

MAO: monoamino oxidase

NCS-1: sensor de cálcio neuronal

NGF: fator de crescimento neuronal

NO: óxido nítrico

PAMP: padrão molecular associado a patógeno

PBS: solução tampão fosfato

PG: prostaglandina

PI4K β -III: fosfatidilinositol 4-hidroxiquinase- β do tipo III

PKA: proteína quinase sensível a AMPc

PP-1: proteína fosfatase 1

SIRS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SNC: sistema nervoso central

TH: tirosina hidroxilase

TNF: fator de necrose tumoral

UTI: unidade de terapia intensiva

VMAT: transportador vesicular de monoaminas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Síntese e metabolismo da DA.....	18
Figura 2: Sinalização dopaminérgica em neurônios pós-sinápticos	20
Figura 3: Representação esquemática do desenho experimental do presente estudo.	27
Figura 4: Efeitos da m-anfetamina em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) sobre o comportamento dos animais.	32
Figura 5: Efeitos da m-anfetamina em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) nos níveis de IL-1 β	33
Figura 6: Efeitos da m-anfetamina em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) nos níveis de IL-6.....	34
Figura 7: Efeitos da m-anfetamina em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) nos níveis de IL-10.....	35
Figura 8: Efeitos da m-anfetamina em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) nos níveis de TNF- α	36
Figura 9: Efeitos da m-anfetamina em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) em BDNF , NGF e Níveis de GDNF.....	37
Figura 10: Efeitos da m-anfetamina em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) nos níveis de DARPP-32.....	38
Figura 11: Efeitos da m-anfetamina em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) nos níveis de NCS-1.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 A SEPSE.....	14
1.2 SEPSE E SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	15
1.3 SISTEMA DOPAMINERGICO.....	17
1.4 FATORES NEUROTRÓFICOS	21
1.5 MODELO ANIMAL DE SEPSE	22
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	26
4.2 ANIMAIS	26
4.3 MODELO ANIMAL DE SEPSE	26
4.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	27
4.5 TESTE DO CAMPO ABERTO	28
4.6 COLETA DAS AMOSTRAS CEREBRAIS.....	28
4.7 IMUNOBLOTTING.....	28
4.8 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	29
4.8.1 Avaliação dos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α	29
4.8.2 Avaliação dos níveis de BDNF, NGF e GDNF	30
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5 RESULTADOS	31
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO A: Parecer do CEUA	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 A SEPSE

A sepse consiste em um importante problema de saúde pública em todo mundo com elevadas taxas de morbidade e mortalidade. É a causa mais comum de mortalidade em Unidades de Terapia Intensivas (UTIs) não coronarianas chegando a taxas de 50-60% (HOTCHKISS et al., 2016; RELLO et al., 2017). Aproximadamente 25% dos pacientes críticos que necessitam de admissão em UTIs apresentam-se com sepse (BRUN-BUISSON, 2006). No Brasil, os gastos com pacientes em UTIs representam aproximadamente 30 a 35% dos custos globais com a área da saúde (MACHADO et al., 2017; SILVA et al., 2004).

As definições de sepse foram desenvolvidas inicialmente na conferência de consenso de 1991 com uma atualização subsequente em 2001 que expandiu a lista de sinais e sintomas de sepse para refletir a experiência clínica à beira do leito (SUAREZ et al., 2011). As definições iniciais de sepse incluíram sepse (síndrome da resposta inflamatória sistêmica [SIRS] e suspeita de infecção), sepse grave (sepse e disfunção orgânica) e choque séptico (sepse e hipotensão refratária mesmo com reposição adequada de fluidos). Sendo a SIRS definida pela presença de no mínimo dois dos seguintes sinais: temperatura central $> 38,3^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$ ou equivalente em termos de temperatura axilar; frequência cardíaca > 90 bpm; frequência respiratória > 20 rpm, ou pressão parcial de CO_2 (PaCO_2) < 32 mmHg; leucócitos totais $> 12.000/\text{mm}^3$, ou $< 4.000/\text{mm}^3$, ou presença de $> 10\%$ de formas jovens – desvio à esquerda (Sigfrido Rangel-Frausto et al., 1995).

Na conferência de consenso de 2016 revisada em 2018, a sepse é definida como uma síndrome caracterizada por disfunção orgânica ameaçadora à vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção. A presença dos critérios da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) não é mais necessária para a definição (SINGER et al., 2016). A disfunção orgânica é definida pela presença de no mínimo dois dos seguintes sinais: hipotensão; oligúria ou elevação da creatinina; necessidade de O_2 para manter $\text{SpO}_2 > 90\%$; contagem de plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$ ou redução de 50% no número de plaquetas em relação ao maior valor registrado nos últimos 3 dias; lactato acima do valor de referência; rebaixamento do nível de consciência; agitação; *delirium* e aumento significativo de bilirrubinas (Sigfrido Rangel-Frausto et al., 1995).

Sabe-se que diversos microrganismos podem desencadear a sepse, no entanto o modelo original para sepse foi a resposta imune a endotoxina, um lipopolissacarídeo (LPS) encontrado nas paredes celulares de bactérias Gram-negativas (DEITCH, 2005). A endotoxina é um excelente exemplo de um padrão molecular associado a patógenos (PAMP). Células do sistema

imune têm receptores que reconhecem diferentes tipos de PAMPs. Os receptores do tipo Toll (TLR) e os receptores de lecitina na superfície celular reconhecem uma variedade de moléculas microbianas desencadeando respostas inflamatórias. Uma vez ativadas, as células imunes produzem fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e mediadores lipídicos como prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs), contribuindo para o estado pró-inflamatório (GOTTS; MATTHAY, 2016; KUMAR, 2020).

Na sepse, ocorre uma resposta inflamatória exacerbada, caracterizada pela superprodução de mediadores e pela excessiva ativação celular, resultando em disfunção orgânica (ISKANDER et al., 2013). Nesse estado pró-inflamatório da sepse observa-se também ativação das células endoteliais e superprodução de óxido nítrico (NO), promovendo aumento de permeabilidade vascular e edema tecidual sistêmicos, que têm consequências deletérias tanto no aporte de nutrientes como na remoção de metabólitos (OKUYAMA et al., 2018).

1.2 SEPSE E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A sepse também pode provocar disfunção severa do sistema nervoso central (SNC), ocasionada por diversos mecanismos patogênicos desencadeados por respostas do hospedeiro à infecção como a ação de mediadores inflamatórios no cérebro ou uma resposta citotóxica mediada por esses mediadores nas células cerebrais (COMIM; CASSOL-JR; et al., 2011; STRECK et al., 2008).

No cérebro, as respostas imunológicas são minuciosamente controladas. Esta regulação, em parte, depende da barreira hematoencefálica (BHE) e, também, através da modulação da resposta das células residentes do cérebro, mais especificamente a micróglia e os astrócitos e, em menores proporções, os neurônios. A micróglia é a principal célula imunológica residente do cérebro. Ela tem por atribuição conferir imunidade inata, porém, os astrócitos e oligodendrócitos, também se encontram envolvidos na resposta inflamatória neural (TAYLOR; MAIN; CRACK, 2013). A micróglia residente no cérebro saudável exibe um fenótipo de repouso, entretanto, sofre ativação quando submetida a tensões, como a invasão do patógeno, lesões ou o acúmulo de proteínas tóxicas, iniciando respostas imunes para estimular o reparo dos tecidos, fazendo a detoxificação de detritos e células apoptóticas. Sua atuação promove a homeostase cerebral através da produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator 1 de crescimento tipo insulina (IGF-1) e citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10) (GABRYŠOVÁ et al., 2014).

Em resposta a estímulos inflamatórios como na sepse, a micróglia é uma das primeiras células a sofrer ativação. As citocinas IL-1 e TNF- α estão relacionadas com processos que levam a ativação da micróglia e subsequentemente à amplificação do processo neuroinflamatório levando a danos neuronais (TAYLOR; MAIN; CRACK, 2013). O descontrole dos estímulos inflamatórios pode acarretar na superprodução de fatores neurotóxicos, contribuindo para disfunção mitocondrial e vascular, dano oxidativo, distúrbios de neurotransmissores e morte celular (BOZZA et al., 2013).

A ativação da micróglia, observada consistentemente na sepse, também desencadeia a liberação maciça de glutamato, exacerbando ainda mais o quadro de excitotoxicidade. A morte neuronal induzida por glutamato pode se dar por ativação de receptores NMDA levando à entrada excessiva na célula de Na⁺ e Ca²⁺ e pela inibição da recaptação de cisteína, fatores esses que, em conjunto, levam ao estresse oxidativo (LIN et al., 2015).

A interface entre o SNC e o sistema circulatório constitui a barreira hematoencefálica (BHE) nos mamíferos. É formada por uma associação entre astrócitos, pericitos e células endoteliais, promovendo a homeostase do parênquima cerebral, regulando o fluxo sanguíneo capilar e atividade sináptica, criando um microambiente favorável ao funcionamento neuronal, papel esse que depende da integridade das células endoteliais da microcirculação no cérebro (ABBOTT; RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006; PAPADOPOULOS et al., 2000). Durante a sepse ocorre ativação das células endoteliais, resultando na disfunção da BHE permitindo a entrada ou a estimulação da síntese e liberação de vários mediadores inflamatórios e moléculas tóxicas no cérebro, causando danos às células neuronais (BOZZA et al., 2010). A disfunção da BHE ainda pode provocar uma alteração severa nos fluxos diferenciais de numerosas substâncias entre o plasma e o líquido cefalorraquidiano (DAL-PIZZOL et al., 2013; HUGHES et al., 2016).

Na sepse, sabe-se que ocorrem alterações na estrutura e funções da mitocôndria dependente da ação das EROs, enquanto a disfunção da mitocôndria também pode agravar a sepse gerando EROs e espécies reativas do nitrogênio (ERNs) (ANDRADES et al., 2011). Associado à alteração da função mitocondrial na sepse com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, ocorre a ativação neutrofílica e, entre uma de suas respostas contra a infecção, ocorre a produção aumentada de EROs e ERNs (ANDRADES et al., 2011; LANGE et al., 2012). Em concentrações elevadas, tais espécies geram o estresse oxidativo, ou seja, um processo deletério celular a lipídios de membrana, proteínas e DNA (SINGER, 2014).

O cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido ao seu alto consumo de oxigênio e presença de lipídios facilmente oxidáveis. Dessa forma, os produtos da peroxidação lipídica podem causar dano cerebral (HALLIWELL, 2006). Sabe-se que a resposta

inflamatória por ação das citocinas ou de EROs provocam dissociação das junções presentes entre as células endoteliais da BHE, diminuindo a proteção às células do SNC, ocorrendo a formação de edema e lesão encefálica, além de favorecer o estado de neuroinflamação pela ativação microglial (DE BOCK et al., 2013). Uma vez que a inflamação persiste, há um aumento na excitotoxicidade por glutamato, dano oxidativo e alterações importantes no metabolismo energético, agravando a encefalopatia séptica e contribuindo para a disfunção e a degeneração neuronal (COMIM; CONSTANTINO; et al., 2011).

Adicionalmente, estudos bioquímicos e comportamentais em humanos e animais vêm demonstrando fortes evidências de que as citocinas inflamatórias podem interferir sobre sistemas de neurotransmissões catecolaminérgica, gabaérgica, colinérgica e glutamatérgica (ADAM et al., 2013). Ainda neste contexto, o sistema dopaminérgico pode estar prejudicado no cérebro séptico (COMIM; CONSTANTINO; et al., 2011; STRECK et al., 2008), levando a danos neuronais e, conseqüentemente, comprometimento comportamental e cognitivo.

1.3 SISTEMA DOPAMINERGICO

A dopamina (DA), um neurotransmissor da família das catecolaminas, é sintetizada por neurônios dos núcleos da base que se projetam por diferentes vias (mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal e túbero-infundibular). Este neurotransmissor participa do ciclo sono-vigília (DZIRASA et al., 2006), é crítico para a motivação, recompensa e aprendizado (WISE, 2004) e modula o controle do movimento voluntário (SCHULTZ, Wolfram, 2007).

A DA é sintetizada a partir de tirosina por duas reações sequenciais catalisadas pelas enzimas tirosina hidroxilase (TH), formação de 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), e descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos (AAAD) (**Figura 1**). A dopamina livre no citosol é rapidamente captada pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT) que utiliza um gradiente eletroquímico de prótons para transportá-la para o interior das vesículas, sendo que este apresenta duas isoformas: VMAT-1, presente na periferia, e VMAT-2, localizado em estruturas do sistema nervoso central (SNC) (ERICKSON; EIDEN; HOFFMAN, 1992). As vesículas contendo o neurotransmissor fundem-se à membrana do neurônio pré-sináptico, após influxo de cálcio pelos canais de cálcio sensíveis a voltagem (STAAL; MOSHAROV; SULZER, 2004).

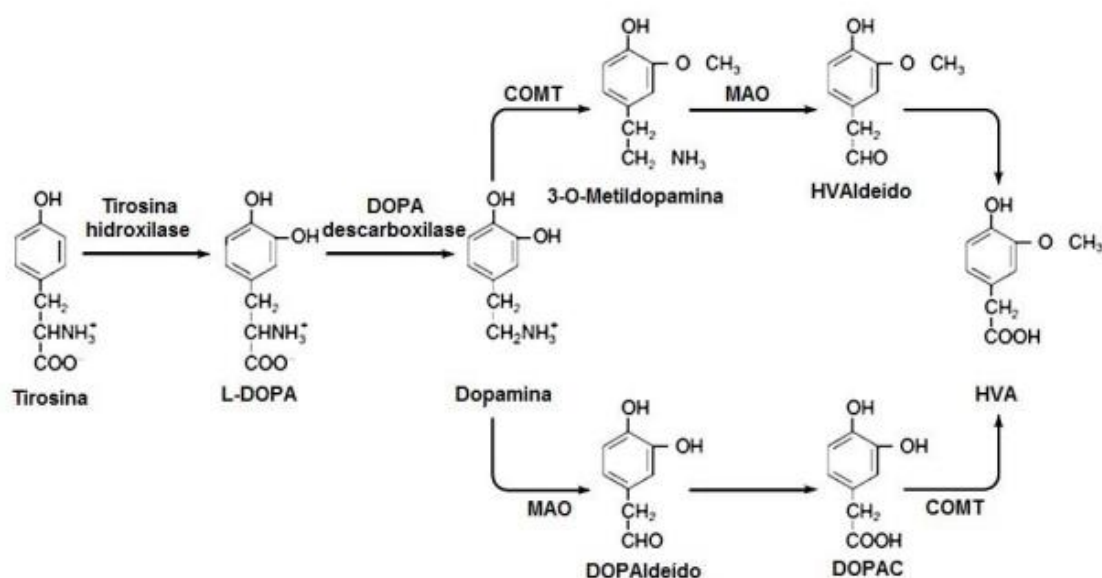


Figura 1: Síntese e metabolismo da DA. A DA é sintetizada pelos neurônios dopaminérgicos pela hidroxilação do aminoácido L-tirosina a L-DOPA pela enzima tirosina hidroxilase. O composto LDOPA sofre descarboxilação pela ação da dopamina descarboxilase, formando DA. Os neurônios dopaminérgicos degradam a DA em ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) pela ação da monoamina oxidase (MAO). O metabólito DOPAC difunde-se para fora das células dopaminérgicas, podendo ser convertido a ácido homovanílico (HVA) pela enzima catecol metiltransferase (COMT). A DA que não foi recaptada é degradada por células da glia, que a convertem em 3-metoxitiramina (3-MT), que é posteriormente oxidado pela MAO para formar HVA (KLEIN et al., 2019).

Após a liberação e interação da DA com receptores pós-sinápticos específicos ocorre a recaptação pelo transportador de DA (DAT) e posterior degradação, no citosol, em produtos inativos pela monoamina oxidase (MAO) e pela catecol metiltransferase (COMT). Esses produtos são 3-metoxitiramina (3-MT), ácido diidroxifenilacético e o ácido homovanílico (HVA) (**Figura 1**) (THORPE et al., 1987).

Os receptores dopaminérgicos específicos são encontrados no sistema nervoso central e periférico e em diversos tecidos não neuronais. Existem 5 tipos de receptores D1, D2 D3, D4 e D5. Ao passo que os receptores D1 e D2, abundantemente expressos, foram detectados por métodos bioquímicos e farmacológicos, os menos abundantes D3, D4 e D5 só recentemente foram detectados (OAK; OLDENHOF; VAN TOL, 2000). Os receptores da DA estão associados a proteínas G e podem ser classificados em duas grandes famílias com base em características bioquímicas, farmacológicas e moleculares. A superfamília dos receptores semelhantes a D1 (receptores D1-like) inclui os receptores D1 e D5. Estes receptores estão ligados à estimulação da adenilato ciclase ativada por dopamina. A superfamília dos receptores semelhantes ao D2 inclui os receptores D2, D3 e D4. Estes receptores ou estão ligados à inibição da adenilato ciclase ou não estão relacionados com a referida enzima. A multiplicidade de respostas de sinalização está

relacionada com o acoplamento de proteínas G a cada receptor, e cada receptor pode interagir com mais de um tipo de proteína G. As interações entre proteínas G e receptores geram efeitos fisiológicos que ora aumentam ora diminuem a resposta inicial do receptor e estimulam vias aparentemente distintas (MISSALE et al., 1998).

A fosfoproteína regulada por AMPc e dopamina de peso molecular-32 kDa (DARPP-32), e sensor neuronal de cálcio (NCS-1), são duas proteínas envolvidas na regulação do sistema dopaminérgico, ambas a jusante na transdução da sinalização da DA (CATONI; CALÌ; BRINI, 2019; SCHEGGI; DE MONTIS; GAMBARANA, 2018).

A DARPP-32 tem desempenhado um papel central na compreensão da sinalização dopaminérgica (GIRAULT; NAIRN, 2021). Localiza-se em neurônios que possuem receptores dopaminérgicos sendo identificada como o maior alvo dos produtos da adenilato ciclase ativada por dopamina (**Fig 2**). Existindo disponibilidade de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), ocorre ativação da proteína quinase sensível a AMPc (PKA) que por sua vez atua fosforilando a DARPP-32 no resíduo de treonina na posição 34 (Thr34), passando a atuar como potente inibidor da proteína fosfatase 1 (PP-1). A PP1, cuja atividade é modulada pela DARPP-32, é capaz de regular o estado de ativação de diversos canais iônicos, receptores e fatores de regulação da transcrição gênica (HSIEH-WILSON et al., 1999; KLEIN et al., 2019).

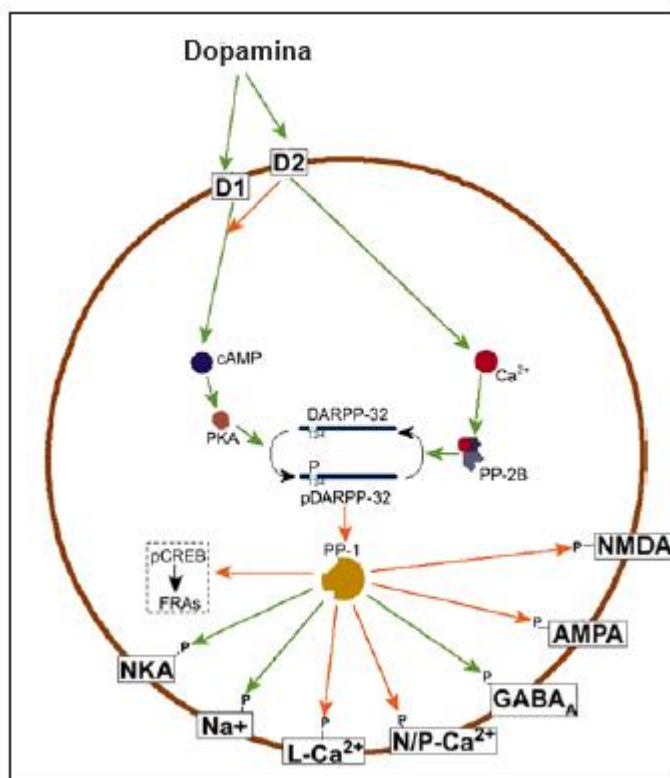


Figura 2: Sinalização dopaminérgica em neurônios pós-sinápticos. Após a estimulação dos receptores D1, e com a disponibilidade de AMPc, ocorre a ativação da proteína quinase A (PKA), que, por sua vez, fosforila a DARPP-32 no resíduo de treonina na posição 34 (Thr34). Quando fosforilada, a DARPP-32 se torna um potente inibidor da proteína fosfatase 1 (PP1). A PP1, cuja atividade é modulada pela DARPP-32, regula o estado de ativação de diversos canais iônicos, receptores e fatores de transcrição gênica. Em contrapartida, a ativação dos receptores D2 reduz a fosforilação da DARPP-32 em Thr34, diminuindo a inibição da PP1. (Greengard et al., 1999 modificado)

Evidências sugerem o envolvimento da NCS-1 no processo de facilitação da neurotransmissão e, possivelmente, em certos transtornos do sistema nervoso, como a esquizofrenia e o transtorno bipolar. Trabalhos têm mostrado que a NCS-1 ocupa uma posição “chave” na regulação de diversas vias de sinalização intracelular. Esta é capaz de inibir/ativar canais de cálcio e potássio dependentes de voltagem, ativar a calcineurina e a óxido nítrico sintase, inibir a guanilato ciclase, dessensibilizar receptores de DA D2, ativar a fosfatidilinositol 4-hidroxiquinase- β do tipo III (PI4K β -III) dentre outras (KABBANI et al., 2002).

O desequilíbrio do sistema dopaminérgico vem sendo relacionado a uma série de distúrbios como comportamento estereotipado e hiperlocomoção (CHARTOFF et al., 2004). Estudos de microdiálise têm mostrado que drogas de abuso aumentam a DA extracelular e imagens cerebrais têm mostrado uma correlação entre euforia e aumento da DA extracelular induzido por psicoestimulantes (DI CHIARA et al., 2004). Também podemos citar seu envolvimento em doenças como a esquizofrenia, que é causada principalmente pela superestimulação de receptores

dopaminérgicos D2 (GRACE, 2016), enquanto a doença de Parkinson está relacionada à depleção progressiva de neurônios dopaminérgicos (KALIA; LANG, 2015). Muitas doenças que afetam o sistema dopaminérgico como parte de sua fisiopatologia também são acompanhadas de alterações comportamentais e de parâmetros inflamatórios (MAROGIANNI et al., 2020).

1.4 FATORES NEUROTRÓFICOS

As neurotrofinas, como BDNF, NGF e GDNF, são proteínas homodiméricas reguladoras da neurogênese, crescimento, diferenciação e plasticidade da rede neuronal, morte celular, migração e diferenciação fenotípica, estando associadas ainda à inflamação e desmielinização autoimune (BARDE, 1996; BUDNI et al., 2015; GÓMEZ-PALACIO-SCHJETNAN; ESCOBAR, 2013). Os fatores neurotróficos, parecem estar implicados na base fisiopatológica de diversas doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, sendo caracterizadas como biomarcadores de vários distúrbios do humor e como alvo molecular chave no desenvolvimento de fármacos para tratamento de distúrbios neurológicos (MCPHEE; DOWNEY; STOUGH, 2020).

A expressão de BDNF no sistema nervoso central é modificada por vários tipos de insultos cerebrais (estresse, isquemia, convulsão, hipoglicemia etc.), e alterações nesta expressão podem contribuir para algumas patologias como depressão, Doença de Alzheimer e Doença de Parkinson (LU; NAGAPPAN; LU, 2015). De acordo com a hipótese neurotrófica da depressão, o estresse é um dos principais fatores associados à redução da atividade do BDNF, o que resulta na diminuição da função das regiões límbicas do cérebro envolvidas no processamento de emoções e cognição (CHEN et al., 2020).

Em estudo pré-clínico foi demonstrado que em 12, 24 e 48 horas após a indução do modelo animal de sepse por CLP houve a redução da expressão de NCS-1 no hipocampo, acompanhada por uma redução nos níveis de BDNF. Esse achado sugere que alterações no NCS-1 e no BDNF cerebrais podem estar associados a alterações comportamentais em ratos sobreviventes à sepse. Além disso, o suposto papel do sistema dopaminérgico na fisiopatologia da sepse também foi sugerido (COMIM et al., 2014). No entanto, faltam informações sobre as consequências a longo prazo da sepse nos parâmetros de sinalização dopaminérgica. É importante observar que a anfetamina crônica pode levar a um comportamento semelhante à mania e à diminuição de fatores neurotróficos, como BDNF, NGF e GDNF, dependendo da dose e do tempo de tratamento (FRIES et al., 2015; VALVASSORI; MARIOT; et al., 2019)

1.5 MODELO ANIMAL DE SEPSE

O primeiro modelo animal de sepsé foi proposto na década de 1930 utilizando-se a endotoxina para reproduzir as manifestações clínicas observadas na sepsé. No entanto, embora este trabalho tenha fornecido informações importantes, o fato de os animais morrerem muito mais rapidamente do que o observado na prática clínica foi uma limitação reconhecida. Atualmente, existem quatro tipos de modelos de sepsé intra-abdominal. Estes incluem a instilação intra-abdominal de produtos bacterianos, pellets fecais, inóculos bacterianos definidos ou a criação de uma fonte endógena de contaminação fecal (DEITCH, 2005).

O modelo de sepsé por LPS é baseado na noção de que é a resposta do hospedeiro às bactérias, e não o patógeno em si, que leva à mortalidade e falência de órgãos. Nesse paradigma, acredita-se que o choque séptico e a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos sejam secundários à ativação de sistemas imunoinflamatórios humorais e celulares derivados do hospedeiro, desencadeados por produtos bacterianos, como a endotoxina (DEITCH, 2005).

Os modelos de pellets fecais foram desenvolvidos inicialmente nas décadas de 1960 e 1970, quando os pesquisadores tentavam separar os fatores associados ao desenvolvimento de peritonite daqueles que levam à formação de abscesso. Neste modelo, as fezes são geralmente administradas junto com um adjuvante, como bário dentro de um grânulo, em uma cápsula de gelatina ou como parte de um coágulo de fibrina. Esses materiais adjuvantes, bem como o uso de cápsulas solúveis ou coágulos de fibrina, foram usados nesses modelos fecais para prevenir a rápida eliminação das bactérias fecais pelo hospedeiro e para prolongar o processo da doença, bem como para modular a taxa de mortalidade. A taxa de mortalidade desses modelos é dependente da dose e da composição bacteriana das fezes utilizadas, variáveis de difícil controle (BARTLETT et al., 1978).

Modelos de inóculo bacterianos definidos são semelhantes aos modelos de pellets fecais, com a exceção de que as bactérias inoculadas no peritônio são definidas. Neste sistema modelo, geralmente, uma cepa de *Escherichia coli* misturado com conteúdo cecal esterilizado (ou outros adjuvantes) é administrado para simular a peritonite humana. Tanto os modelos de inóculo bacteriano definidos, como os modelos de pellets fecais, foram usados para modelar o abscesso intra-abdominal. No entanto, é importante reconhecer que esses modelos experimentais de abscesso intra-abdominal não estão associados à morte e, como tal, não mimetizam sepsé abdominal humana letal. Assim, os modelos de abscesso intra-abdominal, embora úteis para estudar a fisiopatologia da formação de abscesso, não são tão bons para modelar a sepsé abdominal em humanos (DEITCH, 2005).

Podemos considerar a CLP como o protótipo clássico de modelo de criação de uma fonte endógena de contaminação fecal. O modelo CLP está associado a sepse polimicrobiana, bacteremia, uma fase hiperdinâmica precoce e uma fase hipodinâmica tardia. Uma vantagem deste modelo é que a taxa de mortalidade e o tempo até a morte podem ser modulados pelo tamanho da agulha usada para criar um orifício no ceco ligado, bem como pelo número de punções (WICHTERMAN; BAUE; CHAUDRY', 1980). Devido sua aplicabilidade, o CLP se tornou um dos modelos de sepse intra-abdominal mais comuns usados em estudos que investigam a fisiopatologia e o tratamento da sepse abdominal e suas consequências sistêmicas (DEITCH, 2005). O procedimento CLP é o modelo padrão ouro para induzir inflamação sistêmica e suas alterações parecem ter um curso mais prolongado do que outros modelos de sepse (SEEMANN; ZOHLES; LUPP, 2017). Estudos mostram que aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, níveis de citocinas e parâmetros oxidativos podem ser observados no cérebro 24 horas após a CLP (FLORENTINO et al., 2020; YU et al., 2014).

2 JUSTIFICATIVA

Está bem descrito que alterações dopaminérgicas podem alterar as respostas comportamentais e a expressão dos níveis de fatores neurotróficos (FRIES et al., 2015). Além disso, os sistemas dopaminérgicos estão relacionados com citocinas liberadas em resposta ao estresse e à sepse (BEISHUIZEN; THIJIS; WILLIAMS, 2004). Neste contexto, a administração de anfetaminas em ratos é uma excelente ferramenta para desafiar o sistema dopaminérgico, avaliando os mecanismos comportamentais e subjacentes à DA em vários modelos (VALVASSORI; MARIOT; et al., 2019). Isso ocorre porque as anfetaminas estimulam a exocitose vesicular da DA, além de induzirem o transporte reverso desse neurotransmissor pelos transportadores de recaptção, aumentando dramaticamente seus níveis extracelulares (HEAL et al., 2013).

Este estudo investigou a hipótese de que a sepse sensibiliza as respostas comportamentais induzidas pela m-AMPH aguda, ao mesmo tempo em que provoca alterações de parâmetros inflamatórios e neurotróficos. A sepse, uma condição de inflamação sistêmica severa, pode causar disfunções neurológicas devido à resposta inflamatória exacerbada. A m-AMPH, que aumenta a liberação de DA, foi utilizada para avaliar as respostas comportamentais. Parâmetros inflamatórios (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α), de sinalização dopaminérgica (DARP-32 e NCS-1) e fatores neurotróficos (BDNF, NGF e GDNF) foram medidos para investigar a inter-relação entre a resposta inflamatória e as alterações neuroquímicas induzidas pela sepse, além do possível papel do sistema dopaminérgico na fisiopatologia da sepse.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da sepse sobre respostas comportamentais e inflamatórias após estimulação dopaminérgica com m-anfetamina em ratos *Wistar*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da sepse sobre o comportamento locomotor e exploratório de ratos *Wistar* por meio do teste do campo aberto (CA), após a estimulação dopaminérgica com m-anfetamina;

Avaliar os efeitos da sepse sobre parâmetros inflamatórios (níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, e TNF- α), por meio de imunensaio enzimático com as estruturas do hipocampo, córtex frontal e estriado de ratos *Wistar*, após a estimulação dopaminérgica com m-anfetamina;

Avaliar os efeitos da sepse sobre a via de sinalização dopaminérgica (níveis de NCS-1 e DARPP), por meio de técnica de *immunoblotting* com as estruturas do hipocampo, córtex frontal e estriado de ratos *Wistar*, após a estimulação dopaminérgica com m-anfetamina;

Avaliar os efeitos da sepse sobre os níveis de BDNF, de NGF e de GDNF, por meio de imunensaio enzimático no hipocampo de ratos *Wistar*, após a estimulação dopaminérgica com m-anfetamina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente foi executado dentro das diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Todos os procedimentos foram submetidos para avaliação e aprovados sobre o protocolo 041/2013-2 (**Anexo A**) da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

4.2 ANIMAIS

Este estudo utilizou ratos Wistar machos com 60 dias de idade provenientes da colônia da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC. Os animais foram alocados em cinco animais por gaiola (41 x 35 x 16 cm), sob temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa (45-55%) e ciclo dia/luz (12:12h, luz acesa às 06:00h). Os ratos tiveram livre acesso à alimentação (dieta padrão para animais de laboratório - NUVILAB CR-1®, Brasil) e água *ad libidum*. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e a Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC). O presente estudo foi aprovado pela *Comissão de Ética no Uso de Animais Experimentais da Universidade do Extremo Sul Catarinense*.

4.3 MODELO ANIMAL DE SEPSE

Os ratos foram anestesiados pela via intraperitoneal (IP) com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Em seguida, foi realizada uma laparotomia mediana de 3 cm para permitir a exposição do ceco ao intestino adjacente. O ceco foi ligado logo abaixo da junção íleo-cecal com fio seda 3-0, mantendo assim a continuidade intestinal, e perfurado uma vez com agulha calibre 14. O ceco foi então espremido suavemente para expelir uma pequena quantidade de fezes do local da perfuração e depois devolvido à cavidade peritoneal. Com suturas de seda 4.0, a laparotomia foi fechada. Após esse processo, todos os animais retornaram às suas gaiolas com comida e água gratuitas. Os animais do grupo sham-operado foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos, mas o ceco não foi ligado nem perfurado. Após a cirurgia, o grupo com sepse recebeu “suporte básico” (50 mL/kg de soro fisiológico imediatamente e 12 horas após a CLP mais 30 mg/kg de ceftriaxona e 25 mg/kg de clindamicina a cada 6 horas por um total de 3 dias). O grupo controle recebeu apenas 50 mL/kg de solução salina imediatamente e 12 horas após a cirurgia, e o volume de solução salina correspondeu à administração de antibiótico (HUBBARD et al., 2005).

A taxa de mortalidade de ratos induzidos por CLP foi em torno de 30%, o que está de acordo com a literatura (GARCIA et al., 2023).

4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

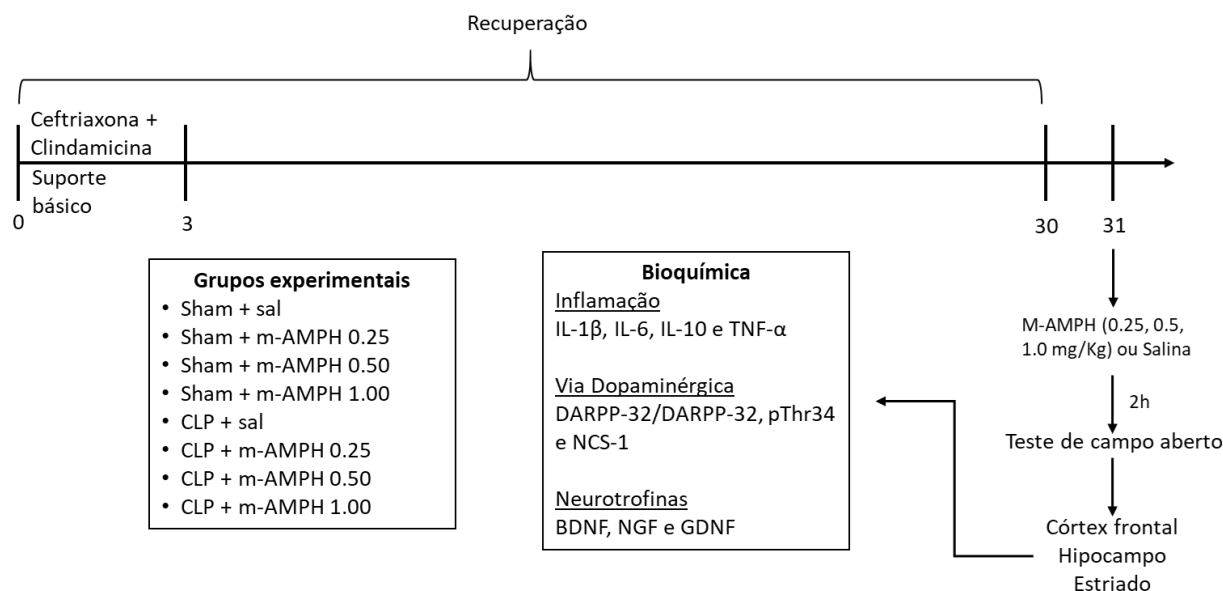


Figura 3: Representação esquemática do desenho experimental do presente estudo. Os animais foram submetidos ao modelo animal de ligadura e punção cecal (CLP) para sepse. 30 dias após a CLP, os ratos receberam uma única administração de solução salina (Sal) ou m-anfetamina (m-AMPH – 0,25 mg/kg, 0,50 mg/kg ou 1,0 mg/kg). Após 2 horas da administração de sal ou m-AMPH, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto. Os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , fosfoproteína regulada por dopamina-cAMP de 32.000 kDa (DARPP-32) e sensor neuronal de cálcio (NCS-1) foram avaliados no córtex frontal, hipocampo e estriado. Os níveis de BDNF, NGF e GDNF também foram avaliados no hipocampo

Trinta dias após o procedimento de CLP, os animais receberam uma única injeção ip de m-AMPH (0,25; 0,50; ou 1,0 mg/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%), de acordo com os grupos experimentais: Sham + Sal; Sham + AMPH 0,25 mg/kg; Sham + AMPH 0,50 mg/kg; Sham + AMPH 1,0 mg/kg; CLP + Sal; CLP + AMPH 0,25 mg/kg; CLP + AMPH 0,50 mg/kg; CLP + AMPH 1,0 mg/kg. Os animais foram submetidos ao teste de campo aberto (OFT) duas horas após a injeção IP. Imediatamente após o teste comportamental, os ratos foram mortos por decapitação e o cérebro foi dissecado no córtex frontal, hipocampo e estriado. As amostras de cérebro foram armazenadas a -80°C para avaliar ainda mais os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , DARPP-32, NCS-1, BDNF, NGF e GDNF (**Figura 3**). A **Tabela 1** descreve o n final de cada grupo para análise comportamental e bioquímica.

Tabela 1 - Número de animais por grupo utilizados para análises comportamentais e bioquímicas.

Grupo	Número de animais para análise comportamental	Número de animais para análise bioquímica
Sham + Sal	10	5
Sham + AMPH 0,25 mg/kg	12	5
Sham + AMPH 0,50 mg/kg	12	5
Sham + AMPH 1,0 mg/kg	13	5
CLP + Sal	09	5
CLP + AMPH 0,25 mg/kg;	09	5
CLP + AMPH 0,50 mg/kg	08	5
CLP + AMPH 1,0 mg/kg	10	5

4.5 TESTE DO CAMPO ABERTO

Todos os testes comportamentais foram realizados manualmente por dois pesquisadores experientes e cegos para o experimento. O aparato utilizado para a realização do CA consistiu em uma caixa com piso de 60 x 60 cm dividida em nove quadrados iguais (20 x 20, um quadrado central e oito quadrados periféricos) separados por linhas pretas. As paredes do aparelho são de fibra de vidro, com 50 cm de altura. Porém, a parede frontal é de vidro. Os animais foram gentilmente colocados no aparelho para explorar a área por 5 min. Depois, o número de cruzamentos (quando os ratos atravessam os quadrados durante todo o período de teste); o número de levantamentos (quando os ratos ficam apoiados nas patas traseiras durante o período de teste); foram avaliados o tempo gasto no canto do aparelho CA, o tempo gasto no centro do aparelho OPT e o tempo de latência para sair do primeiro quadrante (BROADHURST, 1960).

4.6 COLETA DAS AMOSTRAS CEREBRAIS

Após o teste comportamental, os animais foram submetidos a eutanásia, o cérebro foi removido e dissecado em córtex frontal, hipocampo e estriado, de acordo com o atlas de estereotaxia de Paxinos e Watson (PAXINOS et al., 1980). As amostras foram dissecadas em uma placa de Petri e lavadas e limpas com líquido cerebrospinal artificial, alocadas em tubos de eppendorf e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise.

4.7 IMUNOBLOTTING

O córtex frontal, hipocampo e estriado foram sonicados em tampão de lise e permaneceram no gelo por 30 min antes da centrifugação a 12.000 g por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e colocados em microtubos para quantificação proteica. A proteína foi separada em quantidades iguais por eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-

poliacrilamida e depois transferida para membranas de nitrocelulose. Usando anticorpos criados contra DARPP-32 (1:1000 — Santa Cruz Biotechnology), pThr34 DARPP-32 (1:1000 — Santa Cruz Biotechnology), NCS-1 (FL-190, 1:1000 — Santa Cruz Biotechnology) e β -actina (1:3000 - Chemicon International), as membranas foram imunotransferidas sequencialmente durante a noite. A ligação do anticorpo foi revelada por incubação com um anti-coelho de cabra (1:15.000 - Molecular Probes) ou IgG anti-camundongo ligado à peroxidase de rábano (1:7000 - Molecular Probes) por 1h, e sistema de detecção de imunotransferência ECL (Amersham Biosciences). A quimiluminescência detectada pelo ImageQuant e as bandas aparentes foram quantificadas por densitometria e analisadas usando o Scion Image versão Beta 4.0.2 (software Scion Image Frederick, MO). Amostras de tecido foram analisadas em imunotransferências individuais.

4.8 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

As medidas bioquímicas foram normalizadas seguindo o método de Lowry et al. (1951) modificado por Peterson (1977). Todas as análises de amostras foram realizadas em duplicata.

4.8.1 Avaliação dos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α

Amostras de córtex frontal, hipocampo e estriado foram homogeneizados em tampão fosfato. Os níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) e de fatores neurotróficos (NGF e BDNF) foram quantificadas por kits de imunoensaio enzimático (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), conforme as recomendações do fabricante, descritas a seguir. As placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram incubadas durante a noite com o anticorpo de captura. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato de lavagem, e em seguida, foram bloqueadas com uma solução de tampão fosfato com albumina 1% durante 1 hora. Após, foram incubadas as amostras homogeneizadas e a curva padrão, diluídas em solução tampão, durante 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e, em seguida, incubadas com anticorpo de detecção por mais 2 horas. Depois das lavagens, foi incubado uma peroxidase conjugada com estreptavidina por 20 minutos, e após o substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, 1:1), e a reação foi finalizada pela adição de ácido sulfúrico 2N. As placas foram lidas à 450nm em espectrofotômetro. A proteína total foi mensurada de acordo com o método de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

4.8.2 Avaliação dos níveis de BDNF, NGF e GDNF

As amostras foram homogeneizadas em solução tampão fosfato (PBS) com fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM (PMSF) e etilenoglicol bis (éter 2-aminoetílico) - N, N , N'N' - ácido tetraacético (EGTA) 1 mM. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 20 min e os sobrenadantes foram coletados para quantificar os níveis do fator neurotrófico. Os níveis neurotróficos no hipocampo foram avaliados por ensaio imunoenzimático sanduíche utilizando kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante [os níveis de NGF e BDNF foram avaliados com um kit da Chemicon (EUA), e os níveis de GDNF foram avaliados com um kit da Biosensis (EUA)]. Todas as análises de amostras foram realizadas em duplicata.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram analisadas quanto à sua distribuição por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para as variáveis que seguem uma distribuição normal, as diferenças entre os grupos foram analisadas por meio de análise de variância (ANOVA) bidirecional seguida do teste post hoc de Tukey. As diferenças entre grupos de variáveis que não seguem uma distribuição normal foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney. O software utilizado para todas as análises estatísticas e gráficas foi o GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA, www.graphpad.com). Todos os resultados são apresentados como média e desvio padrão (DP) para dados que seguem uma distribuição normal e mediana com intervalo interquartil (25-75) para dados que não seguem uma distribuição normal. Os resultados são considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

A **Figura 4** mostra os efeitos comportamentais da administração aguda de m-AMPH nos ratos submetidos ao modelo animal de sepse induzida por CLP. Pode-se observar que 0,25 e 1,0 mg/kg de m-AMPH aumentaram o número de cruzamentos e levantamentos nos grupos SHAM e/ou CLP. É importante ressaltar que o CLP não influenciou o comportamento locomotor e exploratório dos animais; no entanto, parece que o CLP potencializa os efeitos do m-AMPH a 0,50 mg/kg e 1,0 mg/kg (**Figuras 4a-4b**). Além disso, o CLP diminuiu o tempo gasto no canto do campo aberto em comparação ao grupo SHAM+Sal. A m-AMPH a 1,0 mg/kg também diminuiu este parâmetro nos grupos SHAM e CLP (**Figura 4c**). Ratos induzidos por CLP que receberam AMPH 0,50 e 1,0 mg/kg apresentaram aumento no tempo gasto no centro do campo aberto quando comparados ao grupo SHAM + Sal. Além disso, AMPH 1,0 mg/kg aumentou este parâmetro no grupo SHAM (**Figura 4d**). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos no tempo de latência para sair do primeiro quadrante (**Figura 4e**).

Dados da ANOVA bidirecional: Cruzamento (interação [F (3, 75) = 12,22, p<0,0001]; m-AMPH [F (3, 75) = 49,14, p<0,0001].

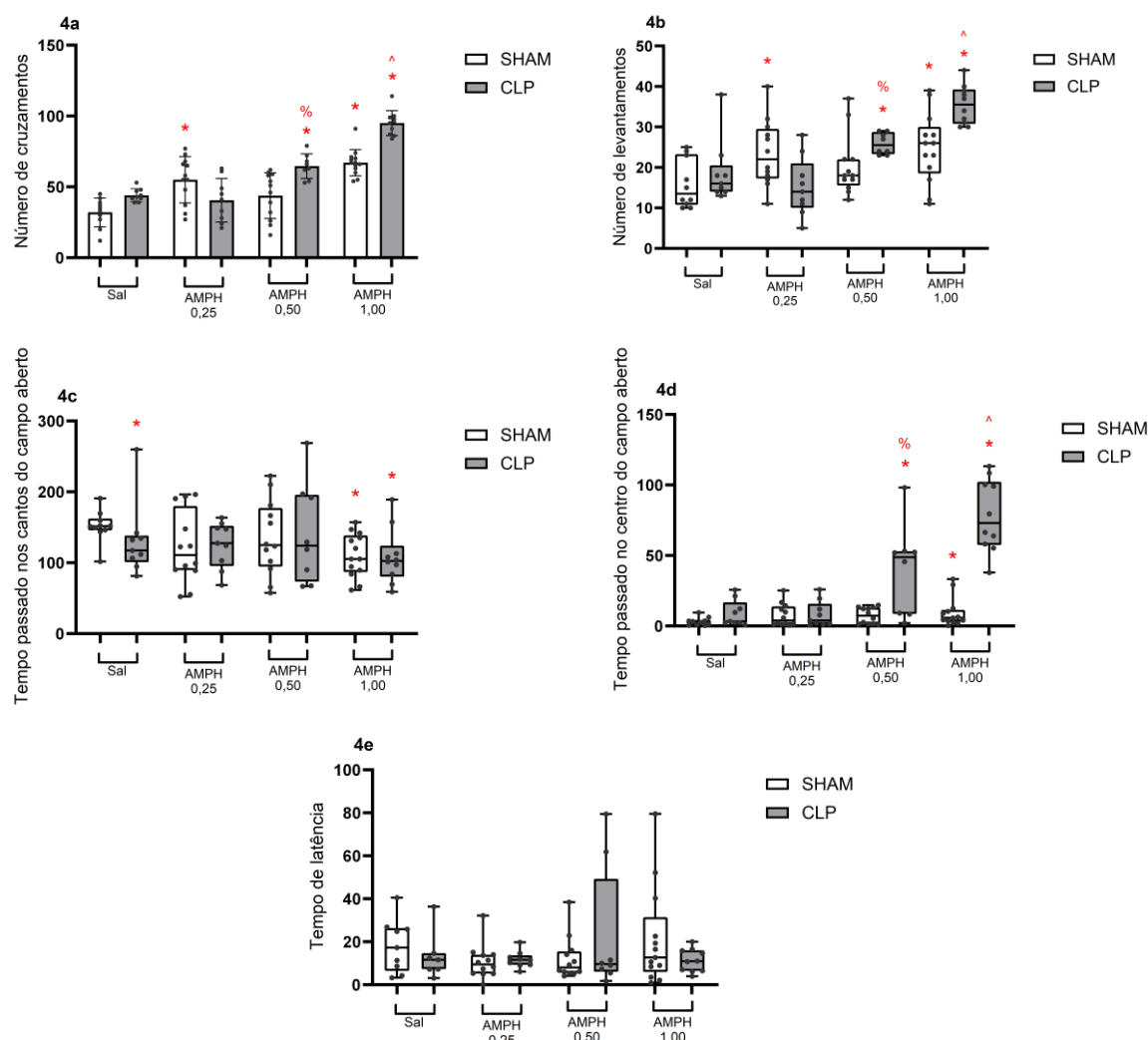


Figura 4: Efeitos da m-anfetamina (m-AMPH – 0,25 mg/kg, 0,50 mg/kg e 1,0 mg/kg) em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) sobre o comportamento dos animais. Os dados são representados como média \pm desvio padrão (número de cruzamentos) ou mediana com intervalo interquartil (25-75, número de levantamentos, tempo no canto do campo aberto, tempo no centro do campo aberto e latência para sair do primeiro quadrante); * $p < 0,05$ comparado ao grupo de Sham + solução salina (sal); % $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham + m-AMPH 0,50 mg/kg, ^ $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham + m-AMPH 1,0 mg/kg de acordo com análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey para dados que seguem uma distribuição normal e Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney para dados que não seguem uma distribuição normal.

Os níveis das citocinas IL-1 β (Figura 5), IL-6 (Figura 6), IL-10 (Figura 7) e TNF- α (Figura 8) foram avaliados no córtex frontal, hipocampo e estriado. Em todos esses parâmetros pode-se observar que o CLP aumentou os níveis de citocinas no córtex frontal e no hipocampo quando comparado ao grupo SHAM. Além disso, a dose de 0,50 mg/kg de m-AMPH potencializou os efeitos do CLP nos níveis de IL-10 em comparação ao grupo CLP + Sal no córtex frontal. A dose de 1,0 mg/kg de AMPH potencializou os efeitos do CLP nos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α em comparação ao grupo CLP + Sal no córtex frontal e hipocampo. Por outro lado, os níveis de citocinas foram aumentados pelo CLP no corpo estriado apenas quando combinado com

AMPH. Curiosamente, AMPH a 0,25 diminuiu os níveis de IL-6 no hipocampo, e AMPH a 0,50 mg/kg diminuiu os níveis de TNF- α no córtex frontal e no hipocampo em comparação com o grupo CLP + Sal. A AMPH por si só não alterou significativamente nenhum parâmetro inflamatório.

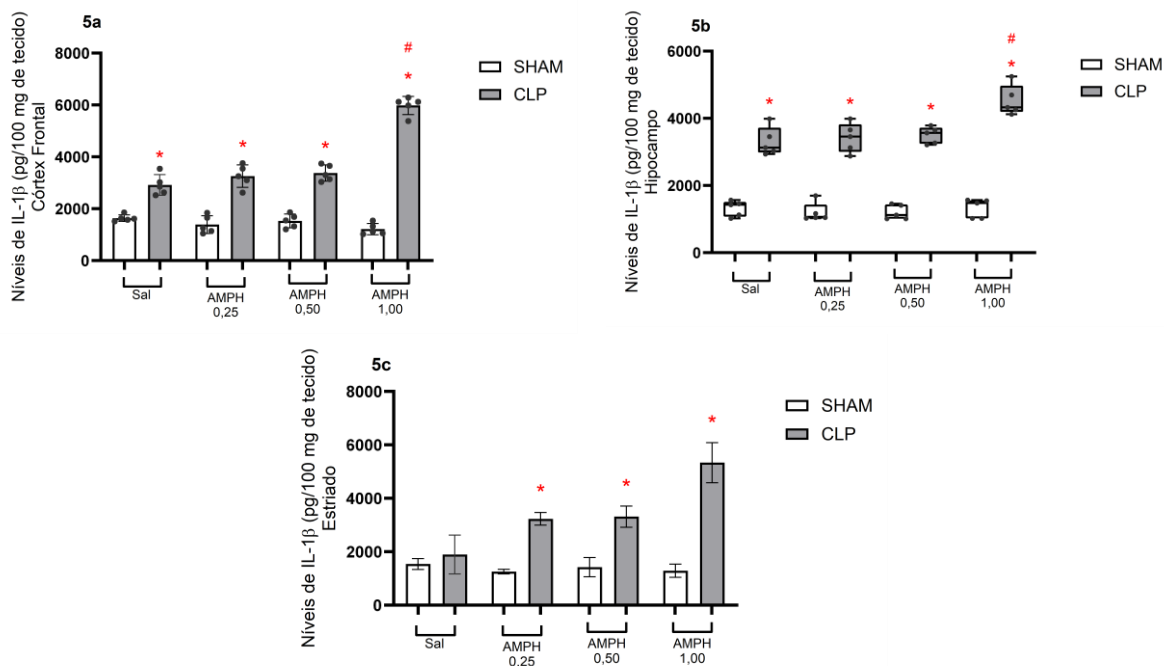


Figura 5: Efeitos da m-anfetamina (m-AMPH – 0,25 mg/kg, 0,50 mg/kg e 1,0 mg/kg) em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) nos níveis de IL-1 β no córtex frontal (5a), hipocampo (5b) e corpo estriado (5c). Os dados são representados como média \pm desvio padrão (córtex frontal e corpo estriado) ou mediana com intervalo interquartil (25-75, hipocampo); * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sham + solução salina (sal); # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP + sal de acordo com análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguida de teste post hoc de Tukey para dados que seguem uma distribuição normal e Kruskal-Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney para dados que não seguem uma distribuição normal.

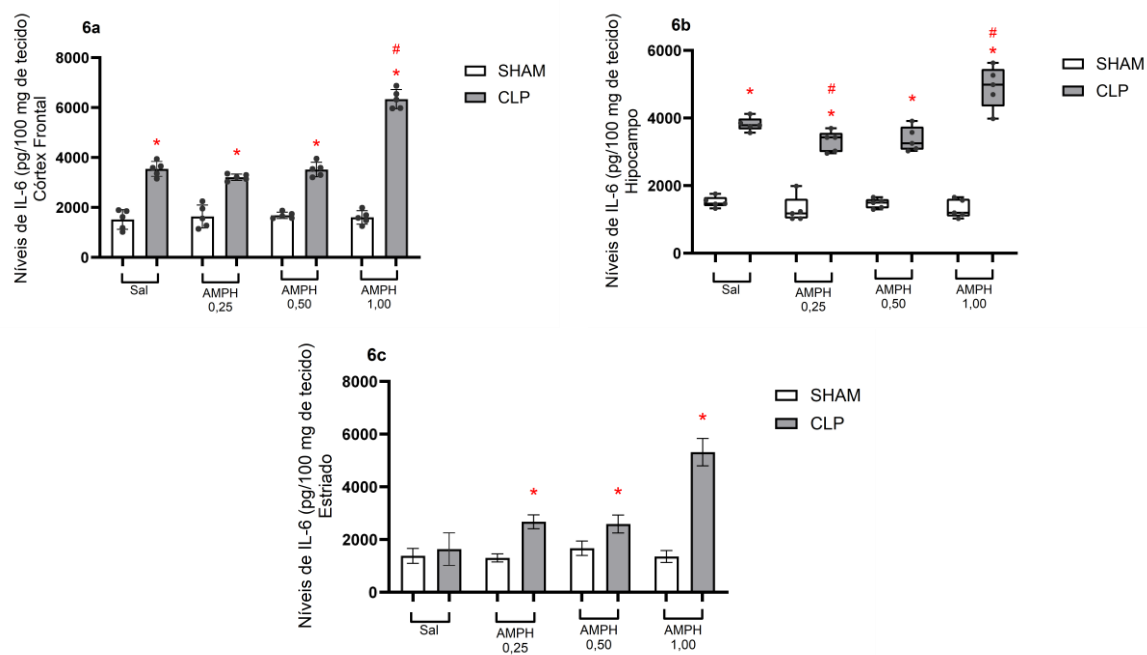


Figura 6: Efeitos da m-anfetamina (m-AMPH – 0,25 mg/kg, 0,50 mg/kg e 1,0 mg/kg) em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) nos níveis de IL-6 no córtex frontal (6a), hipocampo (6b) e corpo estriado (6c). Os dados são representados como média \pm desvio padrão (córtex frontal e corpo estriado) ou mediana com intervalo interquartil (25-75, hipocampo); * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sham + solução salina (sal); # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP + sal de acordo com análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey ou teste U de Mann-Whitney

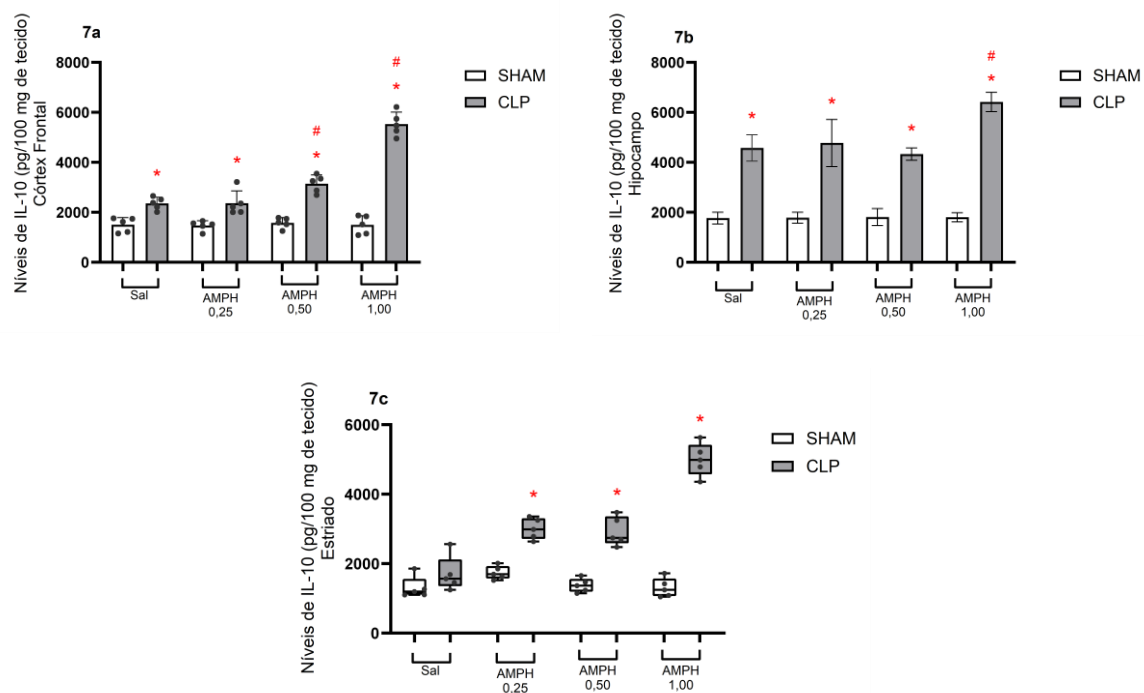


Figura 7: Efeitos da m-anfetamina (m-AMPH – 0,25 mg/kg, 0,50 mg/kg e 1,0 mg/kg) em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) nos níveis de IL-10 no córtex frontal (7a), hipocampo (7b) e corpo estriado (7c). Os dados são representados como média \pm desvio padrão (córtex frontal e hipocampo) ou mediana com intervalo interquartil (25-75, corpo estriado); * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sham + solução salina (sal); # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP + sal de acordo com análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguida de teste post hoc de Tukey para dados que seguem uma distribuição normal e Kruskal-Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney para dados que não seguem uma distribuição normal.

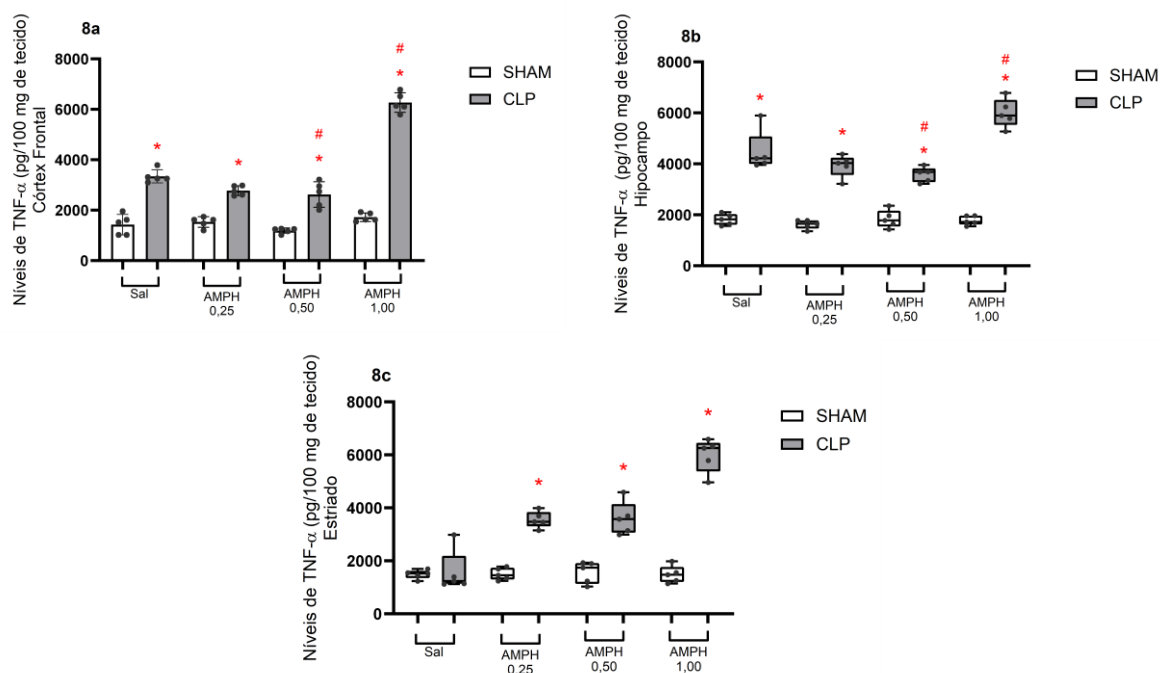


Figura 8: Efeitos da m-anfetamina (m-AMPH – 0,25 mg/kg, 0,50 mg/kg e 1,0 mg/kg) em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) nos níveis de TNF- α no córtex frontal (8a), hipocampo (8b) e corpo estriado (8c). Os dados são representados como média \pm desvio padrão (córtex frontal) ou mediana com intervalo interquartil (25-75, hipocampo e estriado); * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sham + solução salina (sal); # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP + sal de acordo com análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguida de teste post hoc de Tukey para dados que seguem uma distribuição normal e Kruskal-Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney para dados que não seguem uma distribuição normal.

A **Figura 9** mostra os níveis de neurotrofinas BDNF (**Figura 9a**), NGF (**Figura 9b**) e GDNF (**Figura 9c**) no hipocampo. O CLP reduziu os níveis de todas as neurotrofinas avaliadas em comparação ao grupo SHAM + sal. A administração de AMPH na dose de 0,25 mg/kg aumentou os níveis de BDNF e NGF no grupo SHAM e reverteu todas as alterações nos níveis de neurotrofinas causadas pela CLP. AMPH a 0,50 mg/kg também reverteu a diminuição do GDNF. Por sua vez, AMPH na dose de 1,0 mg/kg potencializou os efeitos do CLP quando comparado ao grupo CLP + Sal.

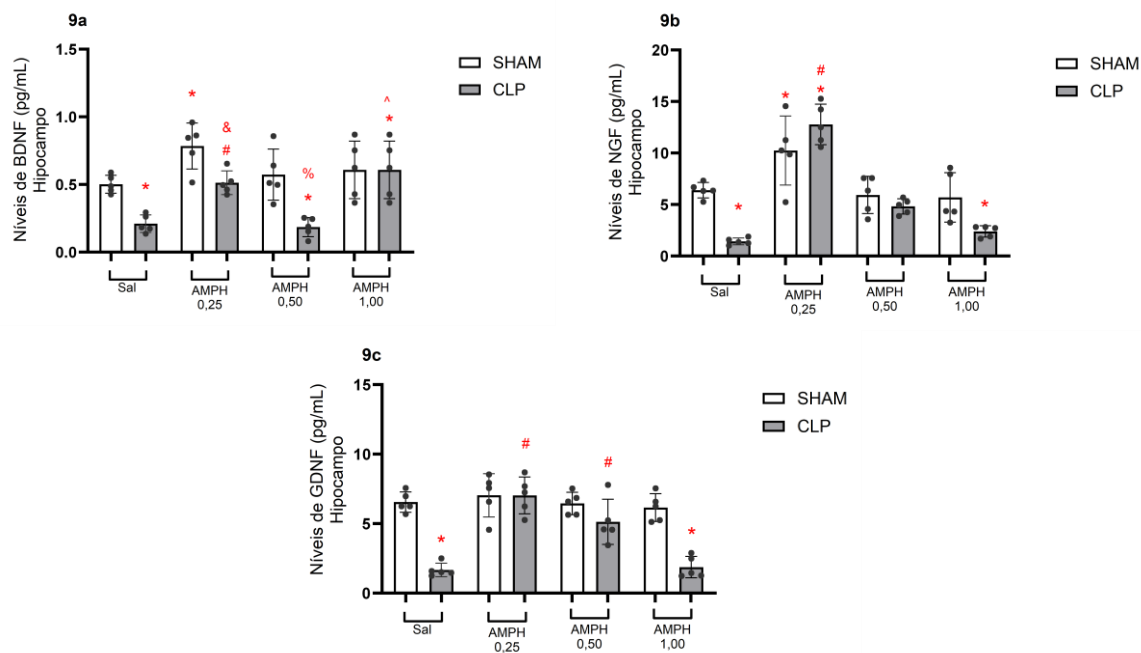


Figura 9: Efeitos da m-anfetamina (m-AMPH – 0,25 mg/kg, 0,50 mg/kg e 1,0 mg/kg) em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) em BDNF (9a), NGF (9b) e Níveis de GDNF (9c) no hipocampo. Os dados são representados como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sham + solução salina (sal); # $p < 0,05$ em comparação com o grupo CLP + sal, & $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham + m-AMPH 0,25 mg/kg, % $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham + m-AMPH 0,50 mg/kg, ^ $p < 0,05$ em comparação com Grupo Sham + m-AMPH 1,0 mg/kg, de acordo com análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida de teste post hoc de Tukey

A **Figura 10** mostra o DARPP-32 total/DARPP-32pThr34 no córtex frontal, hipocampo e estriado. No córtex frontal, os grupos CLP que receberam m-AMPH 0,50 mg/kg e 1,0 mg/kg apresentaram aumento nos níveis de DARPP-32 total/DARPP-32pThr34 quando comparados ao grupo SHAM + sal (**Figura 10a**). No hipocampo, o CLP, quando combinado com a maior dose de AMPH, apresentou níveis aumentados de DARPP-32 total/DARPP-32pThr34 quando comparado ao grupo SHAM + sal (**Figura 10b**). No estriado, os grupos CLP + AMPH nas doses de 0,25, 0,50 e 1,0 mg/kg apresentaram níveis aumentados de DARPP-32 total/DARPP-32pThr34 quando comparados ao grupo Sham + Sal (**Figura 10c**). É importante notar que nem a m-AMPH nem o CLP alteraram estes parâmetros por si só.

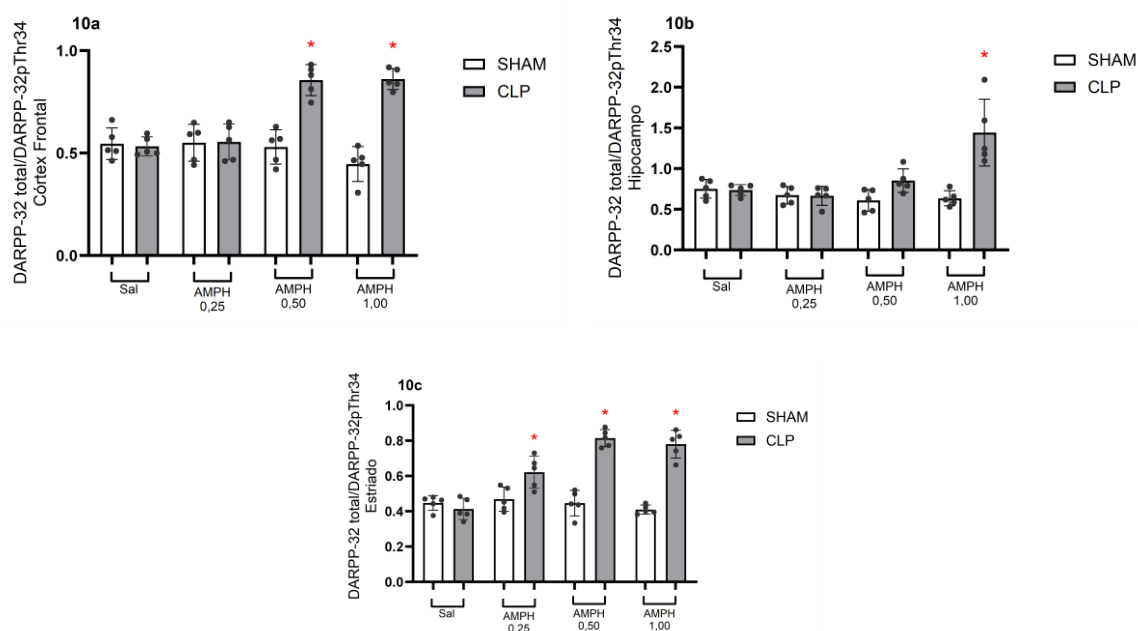


Figura 10: Efeitos da m-anfetamina (m-AMPH – 0,25 mg/kg, 0,50 mg/kg e 1,0 mg/kg) em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) nos níveis de DARPP-32 no córtex frontal (10a), hipocampo (10b) e corpo estriado (10c). Os dados são representados como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Sham + solução salina (sal) de acordo com análise de variância de dois fatores (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey

A **Figura 11** mostra os níveis de NCS-1 total/ β -Actina no córtex frontal, hipocampo e estriado. CLP combinado com AMPH 0,25, 0,50 e 1,0 mg/kg no córtex frontal aumentou os níveis de NCS-1 total/ β -Actina em comparação com SHAM + sal. O grupo CLP + AMPH 0,25 mg/kg no corpo estriado apresentou aumento de NCS-1 total/ β -Actina em comparação ao grupo SHAM+ Sal. Não foi encontrado entre os grupos experimentais no hipocampo.

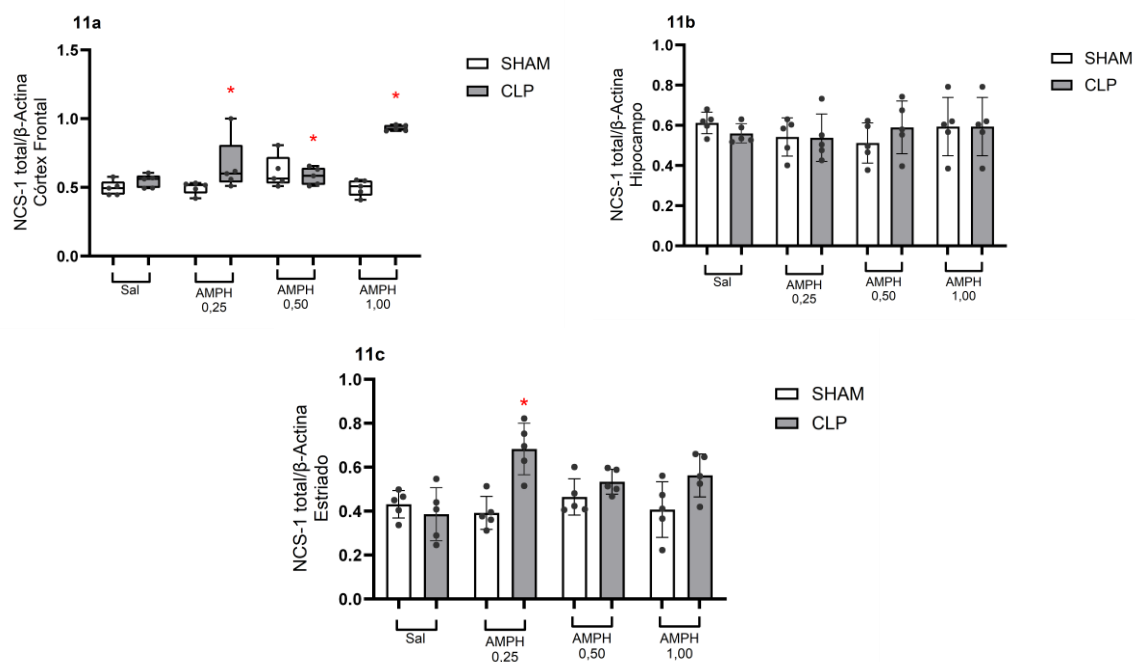


Figura 11: Efeitos da m- Anfetamina (m-AMPH – 0,25 mg/kg, 0,50 mg/kg e 1,0 mg/kg) em ratos induzidos por ligadura e punção cecal (CLP) nos níveis de NCS-1 no córtex frontal (11a), hipocampo (11b) e corpo estriado (11c). Os dados são representados como média \pm desvio padrão (hipocampo e corpo estriado) ou mediana com intervalo interquartil (25-75, córtex frontal) * $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham + solução salina (sal) de acordo com análise de variância bidirecional (ANOVA) seguido do teste post hoc de Tukey para dados que seguem uma distribuição normal e Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney para dados que não seguem uma distribuição normal.

6 DISCUSSÃO

Diversas doenças que envolvem o sistema dopaminérgico em sua fisiopatologia também são associadas a alterações comportamentais e inflamatórias (MAROGIANNI et al., 2020). As anfetaminas, devido à sua semelhança química com a dopamina e a norepinefrina, afetam o sistema catecolaminérgico, elevando os níveis desses neurotransmissores na fenda sináptica por meio do aumento de sua liberação e da inibição de sua degradação (HEAL et al., 2013). Dado que a sepse induzida por CLP frequentemente causa déficits comportamentais, o presente estudo buscou investigar se a sepse altera as respostas comportamentais e bioquímicas dependentes de catecolaminérgicos induzidas pela administração aguda de m-AMPH.

Neste estudo, a administração aguda de m-AMPH, nas doses de 0,25 mg/kg e 1,0 mg/kg, aumentou o comportamento locomotor e exploratório em ratos do grupo SHAM. Essas alterações também foram observadas em ratos submetidos ao modelo CLP, que receberam m-AMPH nas doses de 0,50 e 1,0 mg/kg. Além disso, os ratos CLP que receberam AMPH demonstraram maior tempo gasto no centro do campo aberto, indicando um comportamento de maior risco. Corroborando nossos achados, COMIM et al. (2009) demonstraram que a administração aguda de dextroanfetamina (d-AMPH) em doses de 1,0 e 2,0 mg/kg também aumentou as atividades locomotoras e exploratórias em ratos dos grupos SHAM e CLP. A literatura aponta que tanto a administração aguda quanto crônica de m-AMPH nas doses de 0,25, 0,50 e 1,0 mg/kg elevam a locomoção em ratos (DA-ROSA et al., 2012). A administração crônica ou subcrônica de AMPH (1,0 mg/kg para m-AMPH ou 2,0 mg/kg para d-AMPH) tem sido associada a comportamentos semelhantes à mania em ratos (FREY et al., 2006; MENEGAS et al., 2020; VALVASSORI et al., 2015). No presente estudo, as alterações causadas por m-AMPH em ratos CLP foram significativamente mais acentuadas quando comparadas aos seus respectivos grupos SHAM.

Alguns mecanismos podem ser associados ao aumento de parâmetros inflamatórios relacionados a AMPH, um dos principais é o estresse oxidativo que a anfetamina pode induzir. Esse estresse resulta em danos celulares, ativando a resposta inflamatória e levando à liberação de citocinas. Os radicais livres gerados podem danificar membranas celulares, proteínas e DNA, exacerbando a inflamação cerebral. Adicionalmente, a ativação da microglia, as células imunes do sistema nervoso central. Estudos mostram que a anfetamina pode induzir a ativação da microglia, resultando na produção excessiva de citocinas inflamatórias. A interação com neurotransmissores, particularmente a dopamina, também é significativa; alterações nos níveis destes neurotransmissores podem impactar a função das células imunes no cérebro (JAYANTHI; DAIWILE; CADET, 2021; SHAERZADEH et al., 2018).

O procedimento CLP é amplamente reconhecido como o padrão ouro para induzir inflamação sistêmica, e suas alterações parecem ser mais duradouras do que em outros modelos de sepse (SEEMANN; ZOHLES; LUPP, 2017). Nossos resultados mostraram que, 30 dias após a CLP, os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α estavam aumentados no córtex frontal e no hipocampo. No entanto, a neuroinflamação causada pela CLP parece iniciar logo após o procedimento. Estudos indicam que o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, bem como os níveis de citocinas e parâmetros oxidativos, são detectáveis no cérebro 24 horas após a CLP (FLORENTINO et al., 2020; YU et al., 2014). Esses dados, em conjunto com os achados da literatura, reforçam a ideia de que a inflamação cerebral induzida pela CLP tem um curso prolongado. Além disso, em nosso estudo, ratos CLP que receberam AMPH na dose de 1,0 mg/kg apresentaram níveis de citocinas ainda mais elevados no córtex frontal e no hipocampo, comparados ao grupo CLP + sal. No estriado, diferenças estatísticas nos parâmetros inflamatórios entre os grupos SHAM e CLP só foram observadas quando a administração de AMPH (0,25, 0,50 e 1,0 mg/kg) foi precedida por CLP. É relevante notar que a AMPH não alterou nenhum parâmetro inflamatório no grupo SHAM, um resultado esperado, uma vez que os efeitos inflamatórios da AMPH tendem a surgir em protocolos de administração crônica de 7 a 14 dias (MENEGAS et al., 2020; VALVASSORI; DAL-PONT; et al., 2019). Nossos resultados sugerem que o modelo de sepse causou, realmente, sensibilização do sistema dopaminérgico, ou outro, que provocou aumento dos parâmetros inflamatórios após estimulação com AMPH.

No que diz respeito aos níveis neurotróficos, avaliamos os níveis de BDNF, NGF e GDNF no hipocampo. Consistente com estudos anteriores, nossos resultados indicam que a CLP reduz os níveis de neurotrofinas (FLORENTINO et al., 2020; JI et al., 2018; JIANG et al., 2022). Observamos que a AMPH causou efeitos dose-dependentes nos níveis de BDNF, NGF e GDNF. Em ratos CLP que receberam AMPH a 1,0 mg/kg, os níveis de neurotrofinas foram menores em comparação com o grupo SHAM + sal. Curiosamente, AMPH a 0,25 mg/kg aumentou os níveis de BDNF e NGF no grupo SHAM, efeito também observado em ratos CLP + AMPH 0,25 mg/kg.

A literatura apresenta resultados variados sobre o efeito da AMPH nos níveis neurotróficos, influenciados pelo tempo, dosagem e via de administração. Estudos anteriores mostram que a AMPH reduz os níveis de BDNF, GDNF e NGF no hipocampo (CECHINEL-RECCO et al., 2012; FRIES et al., 2015), embora esses estudos tenham utilizado protocolos crônicos de administração. Devido a essas diferenças metodológicas, comparações diretas com o presente estudo são difíceis. Por outro lado, (MOREIRA DA SILVA SANTOS; KELLY; DOYLE, 2018) demonstraram que 4 administrações agudas de m-AMPH (4,0 mg/kg), com intervalo de 2 horas, aumentaram os níveis

de BDNF no córtex frontal de ratos, sugerindo que o aumento da DA na fenda sináptica pode levar à ativação da proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB), elevando os níveis de BDNF. Além disso, a diminuição dos níveis de BDNF no córtex frontal de camundongos knockout para transportadores de DA sugere uma conexão essencial entre o sistema dopaminérgico e os níveis de neurotrofinas (FUMAGALLI et al., 2003). Com base nesses dados, supomos que a elevação da DA induzida por AMPH a 0,25 mg/kg poderia aumentar os níveis de BDNF, enquanto doses mais elevadas de AMPH poderiam ter um efeito prejudicial.

Nossos resultados sugerem que o CLP parece aumentar a vulnerabilidade do cérebro aos efeitos da AMPH. Conforme descrito no início desta discussão, a AMPH impacta o sistema catecolaminérgico. Resultados importantes da literatura indicam que a sinalização dopaminérgica é impactada por modelos de sepse, conforme demonstrado pela diminuição de células positivas para tirosina hidroxilase (TH) na substância negra mesencefálica 72 horas após a injeção de LPS (HE et al., 2020). Curiosamente, um estudo demonstra que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos está associada ao aumento da sensibilidade à DA (SCHULTZ, W; UNGERSTEDTT, 1977). Além disso, BROWNE et al. (2022) descobriram que o CLP melhorou significativamente os níveis de HVA/DA no hipocampo, um metabólito da dopamina, em camundongos C57BL/6J. Portanto, supomos que alterações na sinalização dopaminérgica poderiam mediar esta vulnerabilidade à resposta AMPH após CLP. Para entender as vias envolvidas nessas alterações, avaliamos os níveis de DARPP-32 total/DARPP-32pThr34 e NCS-1 total/ β -Actina no córtex frontal, hipocampo e estriado.

No presente estudo, nem a CLP nem a AMPH alteraram os níveis de DARPP-32 total/DARPP-32pThr34 nas estruturas avaliadas. De forma consistente, Comim et al. (2014) não encontraram diferenças nos níveis totais de DARPP-32 no córtex frontal e hipocampo após a CLP. Curiosamente, observamos um aumento nos níveis de DARPP-32 total/DARPP-32pThr34 em ratos CLP que receberam AMPH nas doses de 0,25, 0,50 e 1,0 mg/kg. É bem documentado que a administração aguda de AMPH pode aumentar a fosforilação de DARPP-32 em Thr34, o que contribui para o aumento da atividade locomotora induzida pela AMPH (EHRMAN et al., 2006; SVENNINGSSON et al., 2003). No entanto, a AMPH não alterou os níveis de DARPP-32p no grupo SHAM, indicando que as mudanças observadas foram resultado da interação entre a AMPH e a sepse, e não da AMPH isoladamente.

A proteína DARPP-32 é um dos principais alvos da proteína quinase A (PKA) e tem sido amplamente investigada como um potencial ponto de intervenção em distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos (NISHI; SHUTO, 2017). A atividade da PKA é ativada pela ligação da dopamina (DA) ao receptor D1, enquanto a ligação da DA ao receptor D2 inibe essa atividade

(MISSALE et al., 1998). Uma vez ativada, a PKA fosforila o DARPP-32 na posição Thr34, o que resulta na inibição da proteína fosfatase 1 (PP1). Essa inibição de PP1 leva a várias consequências, incluindo o aumento da sensibilidade e condutância dos receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA). A ativação dos receptores NMDA está associada a um aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} , enquanto certas subunidades dos receptores AMPA são menos permeáveis a esse íon (BOCHET et al., 1994; JONAS et al., 1994).

WANG et al. (2004) demonstraram que há padrões distintos de expressão dos receptores NMDA e AMPA em neurônios que contêm DARPP-32 no córtex frontal, hipocampo e estriado. Eles sugeriram que a sinalização D1-DARPP-32-AMPA/NMDA pode desempenhar papéis cruciais na modulação de respostas fisiológicas e na excitotoxicidade em células sensíveis à DA. A excitotoxicidade mediada pelo glutamato está implicada na encefalopatia associada à sepse. Estudos mostram que modelos de sepse, como o LPS, aumentam as concentrações extracelulares de glutamato em certas regiões do cérebro (LIN et al., 2015). Com base nesses dados, postulamos que a sepse poderia aumentar a sensibilidade à DA através da sinalização D1-DARPP-32, potencialmente exacerbando a excitotoxicidade glutamatérgica observada na sepse. No entanto, nossos achados ainda não confirmam uma alteração na sensibilidade dos canais glutamatérgicos mediados por DARPP-32, exigindo mais pesquisas para elucidar essa relação. Ademais, outros neurotransmissores, como a serotonina, também podem influenciar a atividade e a fosforilação do DARPP-32 (DEVROYE et al., 2015). A falta de avaliação dos níveis de neurotransmissores neste estudo representa uma limitação importante.

Curiosamente, observamos um aumento nos níveis de NCS-1 em ratos submetidos à CLP após a administração de AMPH (0,25, 0,50 e/ou 1,0 mg/kg) no córtex frontal e no estriado. Nem a CLP nem a AMPH isoladamente alteraram os níveis de NCS-1 em comparação com o grupo SHAM+sal. Em contraste com nossos achados, COMIM et al. (2014) relataram uma diminuição nos níveis de NCS-1 no córtex frontal 48 horas após a CLP. A diferença entre nossos resultados pode estar relacionada ao tempo de avaliação após a CLP, sugerindo que, em um período mais curto, os níveis de NCS-1 poderiam estar reduzidos, enquanto a longo prazo, esses níveis se normalizariam, embora a estimulação dopaminérgica ainda possa alterá-los.

O NCS-1 desempenha várias funções celulares, incluindo a regulação de Ca^{2+} intracelular e a diminuição da dessensibilização dos receptores D2 da dopamina (KABBANI et al., 2002; NEGYESSY; GOLDMAN-RAKIC, 2005). Como mencionado anteriormente, a ativação dos receptores D2 inibe a atividade da PKA, reduzindo a fosforilação do DARPP-32 em Thr34. O aumento na expressão de NCS-1 no córtex frontal tem sido associado a distúrbios de humor, como

esquizofrenia e transtorno bipolar (BERGSON et al., 2003; KOH et al., 2002). Acreditamos que o aumento nos níveis de NCS-1 observado neste estudo possa ser um mecanismo de feedback para regular a ativação da PKA induzida pelo receptor D1. No entanto, a ausência de alterações nos níveis de NCS-1, como observado no estriado e no córtex frontal, pode indicar uma falha na regulação da resposta à DA causada pela CLP.

É importante destacar que os ratos CLP receberam suporte básico após a cirurgia, que incluiu ceftriaxona e clindamicina. A administração desses antimicrobianos apenas no grupo CLP pode ter impactado a análise comportamental ou bioquímica por meio de mecanismos independentes da sepse, o que poderia confundir os resultados. Além disso, considerando a inflamação sistêmica e crônica induzida pelo CLP, é provável que o metabolismo da AMPH tenha sido alterado, resultando em curvas farmacocinéticas diferentes para o m-AMPH. A ausência de dados individuais ao longo do tempo pode influenciar a extrapolação dos resultados. Por fim, alterações no comportamento exploratório podem ser induzidas por diversas lesões ou manipulações em várias estruturas cerebrais e podem não ser exatamente causadas por alterações dopaminérgicas. No entanto, este estudo encontrou alterações em moléculas relacionadas ao sistema dopaminérgico (DARPP-32 e NCS-1), sugerindo um papel das vias dopaminérgicas nas mudanças comportamentais observadas neste trabalho.

7 CONCLUSÃO

Este estudo reforça que a CLP aumenta a inflamação e diminui os níveis de neurotrofinas em estruturas cerebrais. Esses efeitos da CLP são conhecidos e bem descritos na literatura. Além disso, a descoberta mais importante desta pesquisa é que o CLP poderia impactar o sistema dopaminérgico através de alterações nos níveis de D1/PKA/DARPP-32pThr34 e NCS-1. Portanto, levantamos a hipótese de que a CLP interfere na atividade D1 e D2 e nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} e pode predispor os neurônios à excitotoxicidade pelo glutamato.

Em conclusão, os resultados deste estudo demonstram que a sepsé sensibiliza as respostas comportamentais locomotoras e exploratórias e induz alterações de parâmetros inflamatórios e neurotróficos à m-anfetamina em um modelo de ligadura e punção cecal.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. **Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier**. *Nature Reviews Neuroscience*. [S.l: s.n.], jan. 2006

ADAM, N. et al. **Sepsis-induced brain dysfunction**. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. [S.l: s.n.], fev. 2013

ANDRADES, M. et al. Antioxidant treatment reverses organ failure in rat model of sepsis: Role of antioxidant enzymes imbalance, neutrophil infiltration, and oxidative stress. **Journal of Surgical Research**, v. 167, n. 2, 15 maio 2011.

BARDE, Y.-A. **PHYSIOLOGY OF THE NEUROTROPHINS**. *ANU Rev. Neumsciem*. [S.l.]: Annual Reviews Inc. AU rights reserved, 1996. Disponível em: <www.annualreviews.org>.

BARTLETT, J. G. et al. **A Review Lessons From an Animal Model of Intra-abdominal Sepsis**. [S.l: s.n.], [s.d.]. Disponível em: <<http://archsurg.jamanetwork.com/>>.

BEISHUIZEN, A.; THIJS, L. G.; WILLIAMS, L. **The immunoneuroendocrine axis in critical illness: beneficial adaptation or neuroendocrine exhaustion? Abbreviation HPA hypothalamic-pituitary-adrenal**. *Current Opinion in Critical Care*. [S.l: s.n.], 2004.

BERGSON, C. et al. **Dopamine receptor-interacting proteins: The Ca²⁺ connection in dopamine signaling**. *Trends in Pharmacological Sciences*. [S.l.]: Elsevier Ltd., 1 set. 2003

BOCHET, P. et al. **Subunit Composition at the Single Level Explains Functional Properties of a Glutamate-Cated Channel**. *Neuron*. [S.l: s.n.], 1994.

BOZZA, F. A. et al. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. **Shock**, v. 39, n. 7 SUPPL.1, p. 10–16, maio 2013.

_____. Sepsis-associated encephalopathy: A magnetic resonance imaging and spectroscopy study. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 30, n. 2, p. 440–448, fev. 2010.

BROWNE, C. A. et al. Distinct post-sepsis induced neurochemical alterations in two mouse strains. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 104, p. 39–53, 1 ago. 2022.

BRUN-BUISSON, C. Epidemiology of severe sepsis. **Presse Medicale**, v. 35, n. 3 II, p. 513–520, 2006.

BUDNI, J. et al. **The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. Aging and Disease**. [S.l.]: International Society on Aging and Disease. , 2015

CATONI, C.; CALÌ, T.; BRINI, M. Calcium, dopamine and neuronal calcium sensor 1: Their contribution to Parkinson's disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, 12 fev. 2019.

CECHINEL-RECCO, K. et al. Lithium and tamoxifen modulate cellular plasticity cascades in animal model of mania. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, n. 12, p. 1594–1604, dez. 2012.

CHARTOFF, E. H. et al. Endogenous neurotensin attenuates dopamine-dependent locomotion and stereotypy. **Brain Research**, v. 1022, n. 1–2, p. 71–80, 1 out. 2004.

CHEN, L. et al. Peripheral blood BDNF-TrkB signaling in first-episode, drug-free patients with major depressive disorder and schizophrenia. **Neuroscience Letters**, v. 714, 1 jan. 2020.

COMIM, C. M.; CASSOL-JR, O. J.; et al. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 2, p. 304–311, fev. 2011.

COMIM, C. M.; CONSTANTINO, L. S.; et al. Aversive memory in sepsis survivor rats. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, n. 2, p. 213–217, fev. 2011.

COMIM, C. M. et al. Effects of acute treatment with amphetamine in locomotor activity in sepsis survivor rats. **Journal of Neuroimmunology**, v. 212, n. 1–2, p. 145–147, 25 jul. 2009.

_____. Evaluation of NCS-1, DARPP-32, and neurotrophins in hippocampus and prefrontal cortex in rats submitted to sepsis. **Synapse**, v. 68, n. 10, p. 474–479, 2014.

DAL-PIZZOL, F. et al. **Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis.** *Molecular Neurobiology*. [S.l.]: Humana Press Inc. , 2013

DA-ROSA, D. D. et al. Differences between dextroamphetamine and methamphetamine: Behavioral changes and oxidative damage in brain of Wistar rats. **Journal of Neural Transmission**, v. 119, n. 1, p. 31–38, jan. 2012.

DE BOCK, M. et al. **Endothelial calcium dynamics, connexin channels and blood-brain barrier function.** *Progress in Neurobiology*. [S.l.: s.n.]. , set. 2013

DEITCH, E. A. **Rodent models of intra-abdominal infection.** *Shock*. [S.l.: s.n.]. , dez. 2005

DEVROYE, C. et al. Serotonin_{2C} receptor stimulation inhibits cocaine-induced Fos expression and DARPP-32 phosphorylation in the rat striatum independently of dopamine outflow. **Neuropharmacology**, v. 89, p. 375–381, 2015.

DI CHIARA, G. et al. Dopamine and drug addiction: The nucleus accumbens shell connection. **Neuropharmacology**, v. 47, n. SUPPL. 1, p. 227–241, 2004.

DZIRASA, K. et al. Dopaminergic control of sleep-wake states. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 41, p. 10577–10589, 11 out. 2006.

EHRMAN, L. A. et al. Phosphodiesterase 1B differentially modulates the effects of methamphetamine on locomotor activity and spatial learning through DARPP32-dependent pathways: Evidence from PDE1B-DARPP32 double-knockout mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 5, n. 7, p. 540–551, out. 2006.

ERICKSON, J. D.; EIDEN, L. E.; HOFFMAN, B. J. **Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter (vaccinia virus/transfection/biogenic amine uptake/dilution permeabilization/photoactivation labeling).** *Cell Biology*. [S.l.: s.n.], 1992.

FLORENTINO, D. et al. Early life neuroimmune challenge protects the brain after sepsis in adult rats. **Neurochemistry International**, v. 135, 1 maio 2020.

FREY, B. N. et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. **Life Sciences**, v. 79, n. 3, p. 281–286, 13 jun. 2006.

FRIES, G. R. et al. Memory and brain-derived neurotrophic factor after subchronic or chronic amphetamine treatment in an animal model of mania. **Journal of Psychiatric Research**, v. 68, p. 329–336, 1 set. 2015.

FUMAGALLI, F. et al. BDNF gene expression is reduced in the frontal cortex of dopamine transporter knockout mice. **Molecular Psychiatry**, v. 8, n. 11, p. 898- 899+893, 2003.

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

GARCIA, L. F. et al. Common Variables That Influence Sepsis Mortality in Mice. **Journal of Inflammation Research**, v. 16, p. 1121–1134, 2023.

GIRAULT, J. A.; NAIRN, A. C. DARPP-32 40 years later. **Adv Pharmacol**. [S.l.]: Academic Press Inc., 2021. v. 90. p. 67–87.

GÓMEZ-PALACIO-SCHJETNAN, A.; ESCOBAR, M. L. Neurotrophins and synaptic plasticity. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 15, p. 117–136, 22 mar. 2013.

GOTTS, J. E.; MATTHAY, M. A. **Sepsis: Pathophysiology and clinical management**. **BMJ (Online)**. [S.l.]: BMJ Publishing Group. , 23 maio 2016

GRACE, A. A. **Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression**. **Nature Reviews Neuroscience**. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 19 jul. 2016

GREENGARD, P.; ALLEN, P. B.; NAIRN, A. C. **Beyond the Dopamine Receptor: Review the DARPP-32/Protein Phosphatase-1 Cascade**. **Neuron**. [S.l.: s.n.], 1999.

HALLIWELL, B. **Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now?** *Journal of Neurochemistry*. [S.l: s.n.], jun. 2006

HE, W. et al. TLR4 inhibition ameliorates mesencephalic substantia nigra injury in neonatal rats exposed to lipopolysaccharide via regulation of neuro-immunity. *Brain Research Bulletin*, v. 165, p. 90–96, 1 dez. 2020.

HEAL, D. J. et al. **Amphetamine, past and present - A pharmacological and clinical perspective.** *Journal of Psychopharmacology*. [S.l: s.n.], jun. 2013

HOTCHKISS, R. S. et al. **Sepsis and septic shock.** *Nature Reviews Disease Primers*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 30 jun. 2016

HSIEH-WILSON, L. C. et al. Characterization of the neuronal targeting protein spinophilin and its interactions with protein phosphatase-1. *Biochemistry*, v. 38, n. 14, p. 4365–4373, 6 abr. 1999.

HUBBARD, W. J. et al. **Cecal ligation and puncture.** *Shock*. [S.l: s.n.], dez. 2005

HUGHES, C. G. et al. Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Injury as Risk Factors for Delirium in Critically Ill Patients*. *Critical Care Medicine*, v. 44, n. 9, p. e809–e817, 1 set. 2016.

ISKANDER, K. N. et al. Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding. *Physiol Rev*, v. 93, p. 1247–1288, 2013. Disponível em: <www.prv.org>.

JAYANTHI, S.; DAIWILE, A. P.; CADET, J. L. Neurotoxicity of methamphetamine: Main effects and mechanisms. *Experimental Neurology*, v. 344, 1 out. 2021.

JI, M. huó et al. Short- and Long-Term Protective Effects of Melatonin in a Mouse Model of Sepsis-Associated Encephalopathy. *Inflammation*, v. 41, n. 2, p. 515–529, 1 mar. 2018.

JIANG, S. et al. Preexposure to heat stress attenuates sepsis-associated inflammation and cognitive decline in rats. *Neuroscience Letters*, v. 780, 29 maio 2022.

JONAS, P. et al. **Differences in Ca²⁺ Permeability of AMPA-type Glutamate Receptor Channels in Neocortical Neurons Caused by Differential GluR-B Subunit Expression.** *Neuron*. [S.l: s.n.], 1994.

KABBANI, N. et al. **Interaction with Neuronal Calcium Sensor NCS-1 Mediates Desensitization of the D2 Dopamine Receptor.** . [S.l: s.n.], 2002.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. **Parkinson's disease.** *The Lancet*. [S.l.]: Lancet Publishing Group. , 29 ago. 2015

KLEIN, M. O. et al. **Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases.** *Cellular and Molecular Neurobiology*. [S.l.]: Springer New York LLC. , 31 jan. 2019

KOH, P. O. et al. **Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients.** . [S.l: s.n.], 2002. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.232693499>.

KUMAR, V. **Sepsis roadmap: What we know, what we learned, and where we are going.** *Clinical Immunology*. [S.l.]: Academic Press Inc. , 1 jan. 2020

LANGE, M. et al. Time profile of oxidative stress and neutrophil activation in ovine acute lung injury and sepsis. *Shock*, v. 37, n. 5, p. 468–472, maio 2012.

LIN, H.-C. et al. **Systemic Administration of Lipopolysaccharide Induces Release of Nitric Oxide and Glutamate and c-fos Expression in the Nucleus Tractus Solitarii of Rats.** . [S.l: s.n.], 2015. Disponível em: <<http://www.hypertensionaha.org/http://hyper.ahajournals.org/Downloadedfrom>>.

LU, B.; NAGAPPAN, G.; LU, Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 220, p. 223–250, 2015.

MACHADO, F. R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): An observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180–1189, 1 nov. 2017.

MAROGIANNI, C. et al. **Neurodegeneration and inflammation—an interesting interplay in parkinson’s disease**. **International Journal of Molecular Sciences**. [S.l.]: MDPI AG. , 2 nov. 2020

MCPHEE, G. M.; DOWNEY, L. A.; STOUGH, C. **Neurotrophins as a reliable biomarker for brain function, structure and cognition: A systematic review and meta-analysis**. **Neurobiology of Learning and Memory**. [S.l.]: Academic Press Inc. , 1 nov. 2020

MENEGAS, S. et al. Efficacy of folic acid as an adjunct to lithium therapy on manic-like behaviors, oxidative stress and inflammatory parameters in an animal model of mania. **Metabolic Brain Disease**, v. 35, n. 2, p. 413–425, 1 fev. 2020.

MISSALE, C. et al. **Dopamine Receptors: From Structure to Function**. **PHYSIOLOGICAL REVIEWS**. [S.l: s.n.], 1998. Disponível em: <www.physiology.org/journal/physrev>.

MOREIRA DA SILVA SANTOS, A.; KELLY, J. P.; DOYLE, K. M. Dose-Dependent Effects of Binge-Like Methamphetamine Dosing on Dopamine and Neurotrophin Levels in Rat Brain. **Neuropsychobiology**, v. 75, n. 2, p. 63–71, 1 jan. 2018.

NEGYESSY, L.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Subcellular localization of the dopamine D2 receptor and coexistence with the calcium-binding protein neuronal calcium sensor-1 in the primate prefrontal cortex. **Journal of Comparative Neurology**, v. 488, n. 4, p. 464–475, 8 ago. 2005.

NISHI, A.; SHUTO, T. **Potential for targeting dopamine/DARPP-32 signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative disorders**. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. [S.l.]: Taylor and Francis Ltd. , 4 mar. 2017

OAK, J. N.; OLDENHOF, J.; VAN TOL, H. H. M. **The dopamine D receptor: one decade of research**. **European Journal of Pharmacology**. [S.l: s.n.], 2000. Disponível em: <www.elsevier.nl/locate/ejphar>.

OKUYAMA, T. et al. A sense oligonucleotide to inducible nitric oxide synthase mRNA increases the survival rate of rats in septic shock. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 72, p. 32–40, 30 jan. 2018.

PAPADOPOULOS, M. C. et al. **Pathophysiology of septic encephalopathy: A review**. . [S.l: s.n.], 2000. Disponível em: <www.nlm.nih.gov>.

RELLO, J. et al. **Sepsis: A Review of Advances in Management. Advances in Therapy**. [S.l.]: Springer Healthcare. , 1 nov. 2017

SCHEGGI, S.; DE MONTIS, M. G.; GAMBARANA, C. **DARPP-32 in the orchestration of responses to positive natural stimuli. Journal of Neurochemistry**. [S.l.]: Blackwell Publishing Ltd. , 1 nov. 2018

SCHULTZ, W; UNGERSTEDTT, U. **OWX-?YOX '7K MOI-034YF1)?.00 0 STRIATAL CELL SUPERSENSITIVITY TO APOMORPHINE IN DOPAMINE-LESIONED RATS CORRELATED TO BEHAVIOUR**. . [S.l: s.n.], [s.d.].

SCHULTZ, Wolfram. **Multiple dopamine functions at different time courses. Annual Review of Neuroscience**. [S.l: s.n.]. , 2007

SEEMANN, S.; ZOHLES, F.; LUPP, A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n. 1, 24 ago. 2017.

SHAERZADEH, F. et al. **Methamphetamine neurotoxicity, microglia, and neuroinflammation. Journal of Neuroinflammation**. [S.l.]: BioMed Central Ltd. , 12 dez. 2018

SIGFRIDO RANGEL-FRAUSTO, M. et al. **The Natural History of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) A Prospective Study**. . [S.l: s.n.], [s.d.]. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/>>.

SILVA, E. et al. Open Access Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). 2004. Disponível em: <<http://ccforum.com/content/8/4/R251>>.

SINGER, M. **The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. Virulence.** [S.l.]: Taylor and Francis Inc. , 2014

_____. **The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). JAMA - Journal of the American Medical Association.** [S.l.]: American Medical Association. , 23 fev. 2016

STAAL, R. G. W.; MOSHAROV, E. V.; SULZER, D. Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 341–346, abr. 2004.

STRECK, E. L. et al. **The septic brain. Neurochemical Research.** [S.l.: s.n.]. , nov. 2008

SUAREZ, D. et al. Cost-effectiveness of the surviving sepsis campaign protocol for severe sepsis: A prospective nation-wide study in Spain. **Intensive Care Medicine**, v. 37, n. 3, p. 444–452, mar. 2011.

SVENNINGSSON, P. et al. Diverse Psychotomimetics Act Through a Common Signaling Pathway. **Science**, v. 302, n. 5649, p. 1412–1415, 21 nov. 2003.

TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. **Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. Neurochemistry International.** [S.l.: s.n.]. , abr. 2013

THORPE, L. W. et al. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry Immunocytochemical Localization of Monoamine Oxidases A and B in Human Peripheral Tissues and Brain.** [S.l.: s.n.], 1987.

VALVASSORI, S. S.; DAL-PONT, G. C.; et al. Coadministration of lithium and celecoxib attenuates the behavioral alterations and inflammatory processes induced by amphetamine in an animal model of mania. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 183, p. 56–63, 1 ago. 2019.

VALVASSORI, S. S. et al. Lithium modulates the production of peripheral and cerebral cytokines in an animal model of mania induced by dextroamphetamine. **Bipolar Disorders**, v. 17, n. 5, p. 507–517, 1 ago. 2015.

VALVASSORI, S. S.; MARIOT, E.; et al. The role of neurotrophic factors in manic-, anxious- and depressive-like behaviors induced by amphetamine sensitization: Implications to the animal model of bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 245, p. 1106–1113, 15 fev. 2019.



WANG, W. W. et al. Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in DARPP-32-containing neurons of the cerebral cortex, hippocampus and neostriatum of rats. **Brain Research**, v. 998, n. 2, p. 174–183, 20 fev. 2004.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, A. H. **Sepsis and Septic Shock-A Review of Laboratory Models and a Proposal. JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH.** [S.l.: s.n.], 1980.

WISE, R. A. **Dopamine, learning and motivation. Nature Reviews Neuroscience.** [S.l.]: Nature Publishing Group. , 2004

YU, Y. et al. Inhalation of hydrogen gas attenuates brain injury in mice with cecal ligation and puncture via inhibiting neuroinflammation, oxidative stress and neuronal apoptosis. **Brain Research**, v. 1589, p. 78–92, 17 nov. 2014.

ANEXO A

Resolução

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

Protocolo: 041/2013-2

Professor Responsável: Alexandra I. Zugno.
Equipe: João Luciano Quevedo, Felipe Dal-Pizzol, Clarissa M. Comim, Ana Maria Volpato, Bruna Pescador Mendonça e Monique Michels.

Título: "A sepsé como fator de risco para o desenvolvimento de transtorno de esquizofrenia em ratos Wistar adultos".

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização de 240 Wistar 11 e 60 dias 50g a 200g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

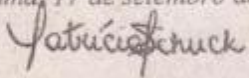
Protocol number: 041/2013-2

Principal Investigator: Alexandra I. Zugno.
Researchers: João Luciano Quevedo, Felipe Dal-Pizzol, Clarissa M. Comim, Ana Maria Volpato, Bruna Pescador Mendonça e Monique Michels.

Project title: "Assessment of behavioral and biochemical sepsis as a risk factor for schizophrenia disorders in adult Wistar rats."

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

Criciúma, 17 de setembro de 2013.


 Patricia Fernanda Schuck
 Coordenadora da CEUA