

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - MG

LETÍCIA REIS

**A CURCUMINA ATENUA OS DÉFICITS COGNITIVOS E O ESTRESSE OXIDATIVO
EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSIS**

**Alfenas/MG
2022**

LETÍCIA REIS

**A CURCUMINA ATENUA OS DÉFICITS COGNITIVOS E O ESTRESSE OXIDATIVO
EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSIS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Ciências pela
Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Neurociências e
Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Co-orientador: Prof. Dr. Lucas César Pinheiro

Alfenas/MG

2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Reis, Letícia

A curcumina atenua os déficits cognitivos e o estresse oxidativo em animais sobreviventes à sepse / Letícia Reis. -- Alfenas/MG, 2022.

129 f. : il. –

Orientador: Dr. Alexandre Giusti-Paiva.

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Alfenas, 2022.
Bibliografia.

1. Memória. 2. Neuroinflamação. 3. Curcumina. I. Giusti-Paiva, Alexandre, orient. II. Título.

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis Goiatá
Bibliotecária-Documentalista CRB/6-425

LETÍCIA REIS

A CURCUMINA ATENUA OS DÉFICITS COGNITIVOS E O ESTRESSE OXIDATIVO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSIS

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde.

Aprovada em: 15 de dezembro de 2022

Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Profa. Dra. Heloisa Helena Vilela Costa

Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UFTM

Profa. Dra. Deidiane Elisa Ribeiro

Instituição: Universidade de São Paulo

USP

Prof. Dr. Tayllon dos Anjos Garcia

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Profa. Dra. Graziela Domingues de Almeida Lima

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Graziela Domingues de Almeida Lima, Professor do Magistério Superior**, em 15/12/2022, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Giusti Paiva, Professor do Magistério Superior**, em 15/12/2022, às 17:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Deidiane Elisa Ribeiro, Usuário Externo**, em 15/12/2022, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Heloísa Helena Vilela Costa, Usuário Externo**, em 15/12/2022, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tayllon dos Anjos Garcia, Professor do Magistério Superior**, em 15/12/2022, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0884157** e o código CRC **2AB935A9**.

LETÍCIA REIS

**A CURCUMINA ATENUA OS DÉFICITS COGNITIVOS E O ESTRESSE OXIDATIVO
EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSIS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Ciências pela
Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Neurociências e
Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Co-orientador: Prof. Dr. Lucas César Pinheiro

Alfenas/MG

2022

“Deem graças em todas as circunstâncias, pois esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus” 1 Tessalonicenses 5:18. Dedico este trabalho à minha mãe Lêda e ao meu padrasto José Carlos, os quais nunca mediram esforços para que este sonho se tornasse real e a minha filha Giovana, amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser o meu alicerce em todos os momentos de minha vida.

Agradeço especialmente à minha mãe Lêda e ao meu padrasto José Carlos por serem o meu porto seguro nos momentos de dificuldades e por não terem medido esforços financeiros para que esse sonho pudesse se tornar realidade. Sem vocês, com certeza, nada disso teria sido possível!

Agradeço ao meu irmão Lucas, à tia Ordália, ao tio José Dias, à prima Bia e à minha sogra Miralva pelas palavras de conforto, orações e por vibrarem junto comigo as minhas conquistas.

Agradeço ao meu companheiro de vida, Pedro, pela sua dedicação, companheirismo, amizade, paciência e positividade em todos os momentos durante essa trajetória, mesmo estando longe. Eu amo muito você!

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva e Prof. Dr. Lucas Cézar Pinheiro pela oportunidade de participar do grupo de pesquisa, pela confiança e por contribuir para a minha formação acadêmica.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Fabiana Giusti, aos colegas de laboratório, ao técnico José Reis, aos meus alunos de iniciação científica e graduação e aos demais funcionários da UNIFAL campus Santa Clara pelo suporte oferecido ao longo desta trajetória.

Agradeço às minhas amigas Priscila, Lídia, Thaís, Paula, Flávia, Rafaela, Tatiane Helena, Luana e Tatiane Oliveira por não terem medido esforços para me auxiliar durante todo o doutorado e, principalmente, pela amizade e companheirismo durante os momentos felizes e difíceis que compartilhamos. Eu sou eternamente grata e levarei todas vocês dentro do meu coração para o resto da minha vida!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade de conquistar este título.

E finalmente, não menos importante, agradeço aos meus “meninos” roedores, os quais deram as suas vidas para que este trabalho fosse concluído em prol da saúde. Exponho, com lágrimas nos olhos, o meu eterno respeito e gratidão a vocês, minhas “bolotinhas” brancas dos olhinhos vermelhos!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A sepse é caracterizada por um conjunto de reações sistêmicas em resposta ao agente infeccioso. O seu desfecho clínico induz lesões cerebrais irreversíveis, as quais podem culminar em danos cognitivos de longo prazo em pacientes sobreviventes à sepse. A propriedade neuroprotetora da *Cúrcuma longa* (curcumina), tem sido amplamente investigada em diversos distúrbios neuropsiquiátricos. Frente a isso, o presente trabalho propôs avaliar o efeito da curcumina sobre as alterações cognitivas e neurodegenerativas induzidas pela sepse. Inicialmente, dividimos aleatoriamente ratos *Wistar* machos em dois grupos experimentais: controle (Sham) e sépticos (CLP), os quais foram submetidos a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal. A caracterização do comportamento cognitivo foi realizada 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse por meio dos testes comportamentais de campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris. Outra leva de animais foi submetida à cirurgia de ligação e perfuração cecal e ao tratamento por gavagem com veículo ou curcumina (50 mg/kg) durante sete dias consecutivos, e o comprometimento cognitivo foi avaliado no décimo dia após a indução da sepse por meio dos testes comportamentais supracitados. Imediatamente após o término desses testes, os animais foram eutanasiados, e o hipocampo dissecado para avaliação do estado redox por meio dos níveis de ROS (pela técnica de fluorescência relativa de lucigenina), nitrosilação proteica, porcentagem de trap, GSH livre e total, TBARS e GSSG (pela técnica de captura de resíduos S-nitrosotiois). As análises do comportamento exploratório mostraram a ausência de prejuízo locomotor nos testes de campo aberto e labirinto aquático de Morris em todos os grupos e dias testados. Como resultado da caracterização do comportamento cognitivo, foi observado um acentuado déficit de cognição e das memórias de reconhecimento e espacial 10 dias após a indução da sepse, os quais permaneceram de forma tempo-dependente a essa condição clínica. Esse déficit cognitivo foi caracterizado pelo aumento do tempo de exploração ao objeto familiar e uma redução do tempo de exploração ao objeto novo e do índice de reconhecimento após 2h e 24h no teste de reconhecimento de objetos, além do aumento das latências para chegar à plataforma e para chegar ao quadrante alvo e pela redução do tempo de permanência no quadrante alvo no teste de labirinto aquático de Morris, quando comparado ao grupo Sham. Quanto aos animais que receberam o tratamento oral com curcumina (50 mg/kg), foi notada uma redução significativa dos prejuízos cognitivos e das memórias de reconhecimento e espacial, 10 dias após a indução da sepse quando comparado ao grupo CLP+veículo. Além disso, foi observado um intenso estresse oxidativo em animais CLP tratados com veículo, apontado pelo aumento expressivo de ROS, nitrosilação proteica e TBARS, além da redução dos parâmetros antioxidantes Trap e GSH livre e total quando comparado ao grupo controle, e o tratamento com curcumina foi eficazmente capaz de atenuar esses parâmetros. A análise do parâmetro GSSG não apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos testados. Diante disso, pode-se concluir que a sepse induzida por ligação e perfuração cecal foi capaz de induzir déficits cognitivos e um intenso estresse oxidativo em animais sobreviventes, e que o tratamento com curcumina foi capaz de atenuar os danos mencionados. Institucionalmente este trabalho está vinculado à UNIFAL-MG e a agência CAPES.

Palavras-chave: memória; neuroinflamação; curcumina.

ABSTRACT

Sepsis is characterized by a set of systemic reactions in response to the infectious agent. Its clinical outcome induces irreversible brain lesions, which may culminate in long-term cognitive damage in sepsis surviving patients. The neuroprotective property of long Turmeric (curcumin) has been widely investigated in several neuropsychiatric disorders. In this perspective, the present study proposed to evaluate the effect of curcumin on cognitive and neurodegenerative alterations induced by sepsis. Initially, we randomly divided male Wistar rats into two experimental groups: control (Sham) and septic (CLP), which were submitted to cecal ligation and puncture surgery to induce sepsis. The characterization of cognitive behavior was performed 10, 20 or 30 days after the induction of sepsis through open field, object recognition and Morris water maze behavioral tests. Another set of animals was submitted to cecal ligation and puncture surgery and treated by gavage with vehicle or curcumin (50 mg/kg) for seven consecutive days. Cognitive impairment was evaluated on the tenth day after induction of sepsis through the behavioral tests already mentioned. Immediately after the end of the behavioral tests, the animals were sacrificed and their hippocampus was dissected for evaluation of redox status through the levels of ROS (by lucigenin allocated fluorescence method), protein nitrosilation, trap percentage, TBARS, free and total GSH and GSSG (by *s*-nitrosotiol residue capture method). As a result of the characterization of cognitive behavior, a marked cognition deficit as well as deficits in the recognition and spatial memories were observed 10 days after the induction of sepsis, which remained in a time-dependent manner to this clinical condition, These deficits were characterized by the increase in exploration time of the familiar object and a reduction in exploration time of the new object and the recognition index after 2 and 24 h in the object recognition test. Also, by the increased latency to reach the platform and to reach the target quadrant and by the reduced length of stay in the target quadrant in the Morris water maze test, when compared to the Sham group. As for the animals that received oral treatment with curcumin (50 mg/kg), a significant reduction in cognitive deficits and recognition and spatial memories impairments was observed 10 days after the induction of sepsis when compared to the CLP+vehicle group. In addition, intense oxidative stress was observed in animals from the CLP+vehicle group, indicated by the expressive increase of ROS, protein nitrosilation and TBARS, and by the reduction of the antioxidant parameters Trap and free and total GSH when compared to the control group. Treatment with curcumin was effectively able to attenuate these parameters when compared to the CLP animals treated with vehicle. The analysis of the GSSG parameter showed no statistically significant difference between the tested groups. Therefore, it can be concluded that sepsis induced by cecal binding and perforation was able to induce cognitive deficits and an intense oxidative stress in surviving animals, and that curcumin treatment was able to mitigate the damage mentioned. Institutionally, this work is linked to UNIFAL-MG and CAPES agency.

Keywords: memory; neuroinflammation; curcumin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização e divisão estrutural do lipopolissacarídeo.....	23
Figura 2 - Ativação periférica da resposta imune inata desencadeada pelo LPS.....	24
Figura 3 - Vias de comunicação entre o sistema imune e o cérebro.....	25
Figura 4 - Disfunção da barreira hematoencefálica durante a sepse.....	28
Figura 5 - Principais tarefas de avaliação de memória e cognição em roedores.....	29
Figura 6 - <i>Cúrcuma longa</i>	40
Figura 7 - Indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	46
Figura 8 - Efeito temporal (10, 20 e 30 dias) sobre o desempenho comportamental nos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris em animais Sham e CLP.....	47
Figura 9 - Efeito do tratamento com curcumina sobre o desempenho comportamental nos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris em animais Sham e CLP.....	49
Figura 10 - Efeito do tratamento com curcumina sobre o estresse oxidativo em animais Sham e CLP.....	50
Figura 11 - Modelo experimental de sepse: CLP	51
Figura 12 - Aparelho referente ao teste de Campo Aberto.....	55
Figura 13 - Aparelho referente ao teste de Reconhecimento de Objetos.....	56
Figura 14 - Aparelho referente ao teste de Labirinto aquático de Morris.....	58
Figura 15 – Taxa de sobrevivência em animais Sham e CLP.....	60
Figura 16 - Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de campo aberto 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	62
Figura 17 - Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos, 10 dias após a simulação ou indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	64
Figura 18 - Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos, 20 dias após a simulação ou indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	66
Figura 19 - Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de	

	reconhecimento de objetos, 30 dias após a simulação ou indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	68
Figura 20 –	Performance comportamental em animais submetidos à etapa de treino do teste de labirinto aquático de Morris 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	69
Figura 21 –	Performance comportamental em animais submetidos ao teste de labirinto aquático de Morris 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse.....	71
Figura 22 –	Performance comportamental em animais submetidos ao teste de labirinto aquático de Morris 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal.....	72
Figura 23 –	Desempenho comportamental no teste de campo aberto em animais submetidos à indução da sepse por ligação e perfuração cecal e ao tratamento com veículo ou curcumina.....	74
Figura 24 –	Desempenho comportamental no teste de reconhecimento de objetos em animais submetidos à indução da sepse por ligação e perfuração cecal e ao tratamento com veículo ou curcumina.....	76
Figura 25 –	Performance comportamental no teste de labirinto aquático de Morris em animais submetidos a indução da sepse por ligação e perfuração cecal e ao tratamento com veículo ou curcumina.....	79
Figura 26 –	Análise dos perfis oxidativo e antioxidativo em animais submetidos a indução da sepse por ligação e perfuração cecal e ao tratamento com veículo ou curcumina.....	82
Figura 27 –	Representação esquemática da sinalização de Nrf2.....	89
Figura 28 –	Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos, 10 dias após a simulação ou indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	123
Figura 29 –	Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos, 20 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal	123
Figura 30 –	Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos, 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal.....	126

Figura 31 - Desempenho comportamental no teste de reconhecimento de objetos em animais submetidos à indução da sepse por ligação e perfuração cecal e ao tratamento com veículo ou curcumina..... 127

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1 - Sistema de <i>score</i> de pontuação de disfunção orgânica completo (SOFA).....	22
Tabela 1 – Grupos experimentais (animais Sham e CLP) 10, 20 ou 30 dias após a cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	47
Tabela 2 – Grupos experimentais (tratamento com curcumina / Sham ou CLP) 10 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal.....	48
Tabela 3 – Análise do tamanho do efeito por meio do <i>d</i> Cohen na taxa de sobrevivência em animais Sham e CLP.....	60
Tabela 4 – Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado no teste de campo aberto, em grupos Sham e CLP (cirurgia), durante 20 minutos (tempo), 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	63
Tabela 5 – Análise do tamanho do efeito por meio do <i>d</i> Cohen no teste reconhecimento de objetos, entre os grupos Sham e CLP, 10 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	65
Tabela 6 – Análise do tamanho do efeito por meio do teste <i>d</i> Cohen no teste reconhecimento de objetos, em grupos Sham e CLP, 20 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	67
Tabela 7 – Análise do tamanho do efeito por meio do teste <i>d</i> Cohen no teste reconhecimento de objetos, em grupos Sham e CLP, 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal.....	68
Tabela 8 – Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado no teste de labirinto aquático de Morris, em grupos Sham e CLP (cirurgia), durante 5 dias (tempo), 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	70
Tabela 9 – Análise do tamanho do efeito por meio do teste <i>d</i> Cohen no teste de labirinto aquático de Morris, entre os grupos Sham e CLP, 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal.....	71
Tabela 10 - Análise do tamanho do efeito por meio do teste <i>d</i> Cohen no teste de labirinto aquático de Morris, entre os grupos Sham e CLP, 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal.....	73

Tabela 11 - Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado no teste de campo aberto, em grupos Sham e CLP tratados com veículo ou curcumina (cirurgia e tratamento), durante 20 minutos (tempo).....	75
Tabela 12 - Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado no teste de reconhecimento de objetos, em grupos Sham e CLP (cirurgia) tratados com veículo ou curcumina (tratamento).....	77
Tabela 13 - Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado no teste de labirinto aquático de Morris, em grupos Sham e CLP tratados com veículo ou curcumina (cirurgia e tratamento) durante 5 dias (tempo).....	80
Tabela 14 - Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado no teste de labirinto aquático de Morris, em grupos Sham e CLP (cirurgia) tratados com veículo ou curcumina (tratamento).....	80
Tabela 15 – Análise do tamanho do efeito por meio do <i>d</i> Cohen no teste reconhecimento de objetos, entre os grupos Sham e CLP, 10 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	83
Tabela 16 - Análise do tamanho do efeito através do <i>d</i> Cohen no teste reconhecimento de objetos, entre os grupos Sham e CLP 10 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	124
Tabela 17 - Análise do tamanho do efeito através do teste <i>d</i> Cohen no teste reconhecimento de objetos, em grupos Sham e CLP 20 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.....	125
Tabela 18 - Análise do tamanho do efeito através do teste <i>d</i> Cohen no teste reconhecimento de objetos, em grupos Sham e CLP 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal.....	126
Tabela 19 - Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado no teste de reconhecimento de objetos, em grupos Sham e CLP (cirurgia) tratados com veículo ou curcumina (tratamento).....	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Enzima acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
ARE	Elemento de resposta antioxidante
A β	Placas beta-amilóides
BHE	Barreira hematoencefálica
BDL	Cirurgia de ligadura do ducto biliar
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CLP	Ligadura e Perfuração Cecal
cm	Centímetros
CNN	Trans cinamaldeído
COX	Cicloxygenase
COX-2	Cicloxygenase 2
CREB	Proteína ligadora ao elemento cAMP
<i>Curcuma longa</i>	Curcumina
Cul3:Rbx1	Complexo culina ubiquitina ligase E3 e proteína caixa de anel
CVOs	Órgãos circumventriculares
DA	Doença de Alzheimer
DAMPs	Padrões moleculares associados à danos
EPM	Média mais ou menos o erro padrão da média
FADD	Proteína associada à Fas com domínio de morte
ES	Tamanho do efeito
EpRE	Elemento de resposta eletrofílica
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
g	Grama
g/Kg	Grama por quilograma
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GSH	Glutathiona

GSSG	Glutationa oxidase
HAS	Hemorragia subaracnóidea
HO	Radicais hidroxila
HO-1	Enzima heme-oxigenase 1
Iba-1	Proteína adaptadora de cálcio ionizada 1
i.c.v	Via intracérebroventricular
i.p.	Via intraperitoneal
i.m	Via intramuscular
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
INF- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzido
IRAK1	Quinase associada ao receptor IL-1
JNK	Jun N-terminal quinase
Keap1	Proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch
Kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
LBP	<i>S-binding protein</i>
LTM	Memória de longa duração
MD2	Receptor MD2
mg	Miligramas
mg/Kg	Miligramas por quilo
mg/ μ l	Miligramas por microlitro
mg/g	Miligramas por grama
ml/Kg	Mililitro por quilo
mmHg	Milímetros de mercúrio
MMP	Metaloproteinases de matriz
MOM	Membrana externa mitocondrial
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NF-K β	Fator Nuclear kappa B
Nrf2	Fator 2 relacionado ao fator eritróide 2
NQO1	Quinona oxidoredutase 1

ON	Óxido nítrico
PAM	Pressão arterial média
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PGE2	Prostaglandinas
PKC	Proteína quinase C
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PSs	Pronto socorros
PGC-1 α	1 α do receptor γ ativado por proliferação de peroxissoma
qSOFA	<i>Quick Sequential Organ Failure Assessment</i>
RAGE	Receptor para glicação avançada de produtos finais
RLU/ μ g	Unidades relativas de luz por micrograma
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de nitrogênio
sMaf	Proteína fibrossarcoma musculoaponeurótico pequeno
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Peróxido dismutase
SOFA	<i>Score Sequential Organ Failure Assessment</i>
STM	Memória de curta duração
TEA	Tempo de exploração do objeto A
TEC	Tempo de exploração do objeto C
TED	Tempo de exploração do objeto D
TBARS	Dano causado pelo estresse oxidativo
TFAM	Fator de transcrição mitocondrial A
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Trap	Capacidade antioxidante total
TRAF 6	Fator 6 associado ao receptor de TNF
TRL-4	<i>Receptor toll-like 4</i>
TUNEL	<i>dUTP nick-end labeling</i>
UTIs	Unidades de terapia intensiva
URIs	Unidades de internação regular
μ M	Micromolar
μ g/Kg	Micrograma por quilo
v.c	Via subcutânea

v.o

Via oral / gavagem

LISTA DE SÍMBOLOS

d	d -Cohen
ω^2	Ômega quadrado
\pm	Mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE	19
1.2	FISIOPATOLOGIA DA SEPSE	23
1.3	MEMÓRIA E COGNIÇÃO	31
1.4	CURCUMINA	38
2	OBJETIVOS	44
2.1	OBJETIVO GERAL	44
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3	METODOLOGIA	45
3.1	ANIMAIS	45
3.2	SUBSTÂNCIAS	45
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	45
3.3.1	Indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal	45
3.3.2	Primeira etapa: Avaliação temporal do efeito da sepse sobre o comportamento cognitivo em animais sobreviventes à sepse	46
3.3.3	Segunda etapa: Avaliação do efeito do tratamento com curcumina sobre as alterações cognitivas e o estresse oxidativo em animais sobreviventes à sepse	48
3.3.3.1	Avaliação do efeito do tratamento com curcumina sobre o comportamento cognitivo em animais sobreviventes à sepse	48
3.3.3.2	Avaliação do efeito do tratamento com curcumina sobre o estresse oxidativo em animais sobreviventes à sepse	49
3.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	50
3.4.1	Indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal	50
3.4.2	Tratamento com curcumina	52
3.4.3	Coleta e processamento de tecido cerebral	52
3.4.4	Avaliação de nitrosilação proteica total	52
3.4.5	Ensaio do ácido tiobarbitúrico	53
3.4.6	Fluorescência Relativa de Lucigenina	53
3.4.7	Capacidade antioxidante total de retenção de radicais	54
3.4.8	GSH e GSSH	54

3.5	TESTES COMPORTAMENTAIS	54
3.5.1	Campo Aberto	54
3.5.2	Reconhecimentos de Objetos	55
3.5.3	Labirinto aquático de Morris	57
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	58
4	RESULTADOS	60
4.1	AVALIAÇÃO DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA EM ANIMAIS SHAM E CLP	60
4.1.1	Taxa de sobrevivência	60
4.2	AVALIAÇÃO TEMPORAL DO COMPORTAMENTO COGNITIVO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE	61
4.2.1	Campo Aberto	53
4.2.2	Reconhecimento de Objetos	69
4.2.3	Labirinto Aquático de Morris	73
4.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CURCUMINA SOBRE O COMPORTAMENTO COGNITIVO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE	73
4.3.1	Campo Aberto	75
4.3.2	Reconhecimento de Objetos	77
4.3.3	Labirinto Aquático de Morris	80
4.3.4	Estresse Oxidativo	84
5	DISCUSSÃO	84
5.1	AVALIAÇÃO TEMPORAL DO EFEITO DA SEPSE SOBRE O COMPORTAMENTO COGNITIVO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE	84
5.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CURCUMINA SOBRE AS ALTERAÇÕES COGNITIVAS E NEURODEGENERATIVAS EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE	90
6	CONCLUSÃO	106
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXOS	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE

O termo sepse é derivado do grego (*sêpsis*), cujo significado é “putrefação” ou “tornar pútrido”. A sepse foi inicialmente caracterizada por Homero (700 a.C) e Hipócrates (400 a.C) como um comprometimento biológico perigoso e odorífero, de mau prognóstico que pode culminar em morte. Porém, somente há pouco mais de um século foi realizada a associação entre a presença de patógenos no organismo e os sinais e sintomas de infecção sistêmica, tornando a sepse sinônimo de infecção grave (SOUZA, 2016; SÃO PEDRO, 2016).

A diversidade de conceitos para caracterizar a fisiopatologia da sepse compôs uma importante restrição para o seu melhor entendimento. As nomenclaturas anteriormente utilizadas como infecção generalizada, septicemia ou síndrome séptica geravam discordâncias nos pontos de vista assistencial e científico. Uma vez que a não uniformidade dos critérios de inclusão da sepse em diferentes estudos clínicos prejudicou demasiadamente a avaliação da eficácia de tratamentos. Assim, a implantação de uma definição padronizada para a correta identificação de pacientes sépticos fez-se necessária (OLIVEIRA, 2020).

Nesse sentido, o consenso internacional de definição de sepse e choque séptico (Sepsis-3) passou a definir os conceitos anteriores como sepse. Essa nomenclatura retrata a sua fisiopatologia como uma disfunção orgânica secundária à resposta inflamatória sistêmica do organismo, mediante a presença de um agente patogênico e com alto risco de morte. Além disso, o termo sepse realça as dificuldades que os profissionais da saúde enfrentam em tratar os pacientes devido às suas diversas complicações, tais como: alterações nos sistemas cardiovascular, hepático, pulmonar, renal, hormonal, metabólico, homeostático e neuronal (GASPAROTTO *et al.*, 2017; JORDÃO *et al.*, 2019).

Com relação às alterações neuronais, 71% dos pacientes sobreviventes à sepse apresentam disfunção cerebral aguda ou crônica caracterizada pela lentificação dos processos mentais, déficits de atenção e memória, desorientação, *delirium* ou coma. Estudos recentes mostram que os pacientes sobreviventes à sepse, que não apresentaram disfunção cerebral de curto prazo, possuem um risco aumentado de desenvolver prejuízos das capacidades cognitivas associadas à memória e à função executiva, o qual persiste por até 8

anos após o evento séptico inicial (SINGER, 2014; ZONTA *et al.*, 2018; GIROFALO *et al.*, 2019; WINDMANN *et al.*, 2014).

Os pacientes com histórico de sepse também possuem frequências elevadas de eventos convulsivos. A agitação psicomotora gera alterações intracranianas e induz déficits neurológicos focais, transtornos de humor e de interação social, problemas de coordenação motora e declínio da racionalidade, consciência, compreensão, processamento mental, atenção e cognição. Além disso, a inflamação e o estresse oxidativo oriundos da sepse desempenham um papel proeminente na morte de neurônios de regiões importantes nos processos de aprendizagem e formação de memórias como: núcleo pré-óptico mediano, zona subventricular, córtex e hipocampo (CHAUDHRY; DUGGAL, 2014; GU *et al.*, 2021; MOLNAR *et al.*, 2018; SONNEVILE *et al.*, 2013 ZAMPIERI *et al.*, 2011)

Como mencionado, a sepse é responsável por desencadear um quadro clínico grave. Por isso, cerca de 54% dos pacientes necessitam de um longo período de internação em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), o que implica em elevados custos para os sistemas de saúde. O custo de um caso de sepse na Europa foi estimado entre US\$ 26 mil a 32 mil, enquanto nos Estados Unidos da América o custo é de aproximadamente US\$ 38 mil. Já no Brasil, os pacientes diagnosticados com sepse grave e choque séptico representam em média um gasto diário de US\$ 934 (R\$ 3.026), podendo o custo total chegar a US\$ 10 mil (R\$ 32,4 mil) (SINGER *et al.*, 2016; PAIÃO, 2015; ILAS, 2019).

Somente no Brasil são diagnosticados 600 mil casos de sepse por ano, sendo essa circunstância responsável pela morte de aproximadamente 390 mil pessoas (65% dos casos). Esses dados configuram uma taxa de mortalidade 25% maior que a média mundial, a qual encontra-se entre 30 a 40%. Em nosso país, a sepse é responsável pela ocupação de 25% de leitos de UTIs, as quais lideram com 55,5% o *ranking* de óbitos, seguidas das Unidades de Internação Regular (URIs) com 37,8% e por último, os Prontos-Socorros (PSs) com 23,1% das ocorrências. Ademais, a mortalidade de pacientes com sepse e choque séptico nos hospitais privados corresponde a 23,4% e 56,2%, respectivamente, enquanto nos hospitais públicos encontra-se entre 44,2% e 72,9% (ILAS, 2019).

Estudos epidemiológicos mostram que a taxa de mortalidade em indivíduos acometidos com sepse após a fase aguda é de 30% nos primeiros 6 meses. Além disso, foi evidenciado que mais de um quinto dos pacientes sobreviventes à sepse aguda morrem nos primeiros dois anos de causas não relacionadas ao seu estado de saúde anterior à sepse, e

que o risco de morte persiste por até 5 anos após o evento séptico inicial (YENDE *et al.*, 2016; ZAGHLOUL *et al.*, 2017; ZONTA *et al.*, 2018).

Frente ao exposto, o diagnóstico rápido e preciso da sepse é de fundamental importância para propor medidas eficientes relacionadas ao seu tratamento e prognóstico, uma vez que favorece a sobrevivência dos pacientes e gera um menor tempo de internação e gasto para os sistemas de saúde. Porém, parte das manifestações clínicas observadas durante o curso da sepse podem ser confundidas com infecções inespecíficas, o que dificulta a sua rápida identificação. Desse modo, a implantação efetiva de protocolos de sepse e de treinamentos de uma equipe multiprofissional são imprescindíveis para que os mesmos estejam aptos para identificar de forma rápida e precisa os sinais e sintomas desencadeados pela sepse (WEST *et al.*, 2017; ROTHMAN *et al.*, 2017).

Anteriormente, a sepse era caracterizada apenas pela presença de infecção associada à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). A SIRS é determinada pela alteração de pelo menos duas das quatro variáveis: frequência cardíaca (>90 bpm), frequência respiratória (20 ipm ou PaCO₂ 12.000), temperatura corporal (38°C) e presença de >10% de células imaturas no hemograma. Entretanto, as alterações clínicas mencionadas estão associadas à presença de uma resposta inflamatória inespecífica, a qual pode estar presente em 96% dos pacientes admitidos em UTIs (DELLINGER *et al.*, 2013; VINCENT *et al.*, 2013; ZAGHLOUL *et al.*, 2017).

Diante disso, o diagnóstico para a sepse passou a ser realizado por dois sistemas criteriosos de pontuação: o *Quick Sequential Organ Failure Assessment (qSOFA)* e o *Score Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)*. Primeiramente, é realizada a triagem da disfunção dos órgãos por meio do sistema *qSOFA*. O paciente suspeito deve apresentar pelo menos dois dos três critérios de avaliação: alteração do estado mental, pressão sanguínea sistólica menor ou igual a 100 milímetros de mercúrio (mmHg) e taxa respiratória superior ou igual a 22 incursões por minuto (ipm) (JORDÃO *et al.*, 2019; SINGER *et al.*, 2016).

Após a triagem inicial, o *SOFA* é utilizado para a confirmação do diagnóstico da sepse e acompanhamento do quadro clínico. Esse sistema consiste na avaliação individual dos sistemas de coagulação, respiratório, neurológico, hematológico, renal, hepático, cardiovascular e do uso de drogas vasoativas, através de um *score* de pontuação que varia entre zero a quatro pontos. A sepse é constatada quando o *score* de pontuação *SOFA* apresenta uma variação de dois ou mais pontos, sendo diretamente proporcional à gravidade da disfunção orgânica (Quadro 1) (SINGER *et al.*, 2016).

Quadro 1 - Sistema de *score* de pontuação de disfunção orgânica completo (SOFA)

SOFA	0	1	2	3	5
Respiração PaO ₂ /FiO ₂ mmHg	>400	<400	<300	<200	<100
<100 Coagulação -Plaquetas 10 ³ mm ³	>150	<150	<100	<50	<20
Hipotensão Cardiovascular (mmHg)	PAM >70	PAM <70	Dopamina <5 ou Dobutamina qualquer dose	Dopamina <5 ou Epinefrina <0,1 ou Norepinefrina <0,1	Dopamina >15 ou Epinefrina >0,1 ou Norepinefrina >0,1
Fígado Bilirrubina (mg/dl) SNC	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,0	6,0 – 11,9	<12,0
Escala de coma de Glasgow Renal	>14	13 - 14	10 - 12	6 - 9	<6
Creatinina mg/dl e débito urinário ml/dl	<1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9 <500	>5,0 <200

Fonte: Adaptado de SINGER *et al.*, 2016.

Nota: O quadro 1 apresenta a disfunção orgânica presente na sepse, representada pela alteração dos sistemas: respiratório, estimado pelo índice de oxigenação (PaO₂/FiO₂); hematológico, mensurado pela coagulação através das plaquetas; cardiovascular, avaliado pela pressão arterial média (PAM) e drogas vasoativas; hepático, pela presença de bilirrubina; neurológico, por meio da escala de coma de Glasgow; e renal, quantificado pela creatinina e pelo débito urinário. Cada sistema é avaliado separadamente e considera-se sepse a variação de dois ou mais pontos no SOFA.

Como evidenciado, a sepse configura um importante papel na saúde pública mundial, uma vez que o seu ônus não se limita apenas à gravidade do quadro clínico e à alta taxa de mortalidade. Os pacientes, quando sobreviventes, possuem alto risco de desenvolvimento de diversas complicações de longo prazo, entre elas os déficits cognitivos e de memória. Frente a isso, o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos durante a sepse torna-se necessário para a tentativa de melhorar a qualidade de vida desses pacientes (ANGUS; POLL, 2013; GOLDIM, 2018).

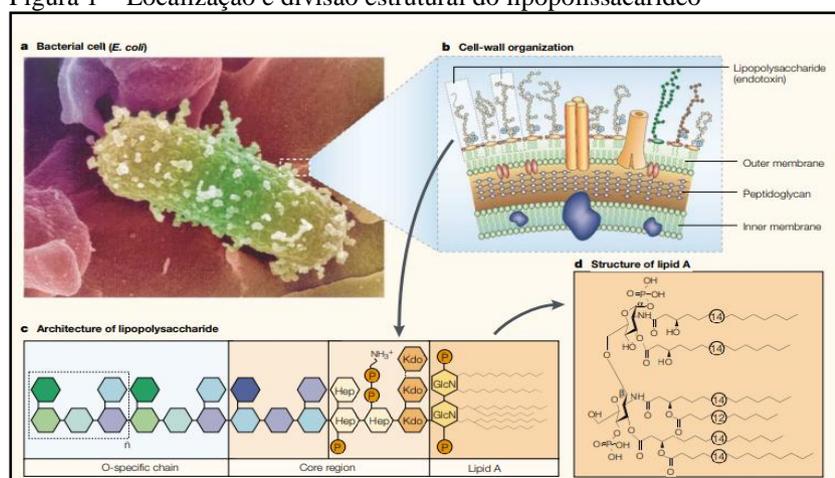
1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

A fisiopatologia da sepse é um processo dinâmico, que está intrinsecamente relacionado à interação entre o hospedeiro e a sua resposta de defesa aos microrganismos infectantes. Os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como o

lipopolissacarídeo (LPS), foram postulados como os principais desencadeadores da sepse, enquanto os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) são considerados os principais agravantes dessa condição clínica. A capacidade de ambos de ativar a via de receptores da família *Toll-like receptor* (TRL) tem sido sugerida como a chave do entendimento da resposta imune à sepse (DAL-PIZZOL, TOMASI, RITTER, 2014).

A ativação inicial desta via consiste na interação entre o TLR e os PAMPs. Em especial, o LPS é o principal componente molecular da parede celular de bactérias gram negativas, tais como a *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, comumente vistas em processos sépticos. Estruturalmente, o LPS é constituído pelo antígeno-O (polissacarídeos O específicos), oligossacarídeos e componentes do lipídio A. Responsável por conferir a especificidade sorológica das bactérias, o antígeno-O é composto por 40 unidades repetitivas de fosfolipídios, únicas entre as bactérias, as quais estão localizadas na parte mais externa e hidrofílica da membrana (Figura 1) (HOOGLAND *et al.*, 2015; MANSOUR; HASSAN; GEORGY, 2018).

Figura 1 – Localização e divisão estrutural do lipopolissacarídeo



Fonte: Adaptado de BEUTLER; RIETSCHHEL, 2003.

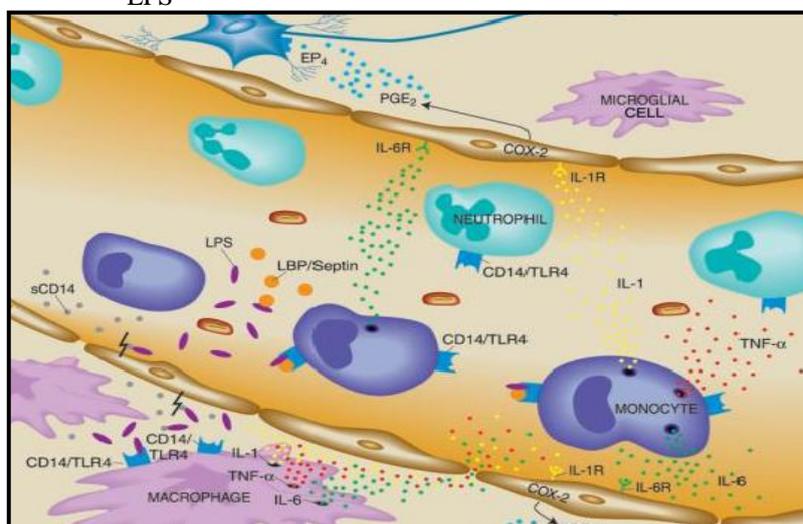
Nota: Em A, temos a micrografia eletrônica de *Escherichia coli*. Em B, temos a representação esquemática da localização do LPS na parede celular bacteriana. Em C, temos a arquitetura do LPS. E em D, temos a estrutura primária do centro tóxico do LPS, o componente lipídico A.

Como demonstrado na Figura 1, os oligossacarídeos (ou *core*) estão localizados no centro da molécula. Essa estrutura é encarregada de se ligar ao antígeno O na sua parte externa, e ao lipídio A pela sua porção interna. E, por fim, o lipídio A é uma porção glicofosfolipídica incumbida de ancorar o LPS na membrana externa das células do sistema

imune. Portanto, é a região responsável por ativar periféricamente a resposta inflamatória no hospedeiro (REIS, 2018; SU, DING, 2015).

Uma vez presente na corrente circulatória do hospedeiro, o LPS necessita da presença da lipoproteína de alta densidade *S-binding protein* (LBP) para ser transportado. Em vista disso, o LPS liga-se à LBP formando o complexo (LBP:LPS), que é reconhecido por receptores CD14–MD2 presentes nas membranas de monócitos e neutrófilos circulantes. Esses receptores, por sua vez, enviam sinais para o TRL que estimula uma cascata intracelular de fosforilação proteica, culminando na ativação do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) (Figura 2) (REIS, 2018; DANIELSKY *et al.*, 2018).

Figura 2 – Ativação periférica da resposta imune inata desencadeada pelo LPS



Fonte: HANG; RIVEST, 2003

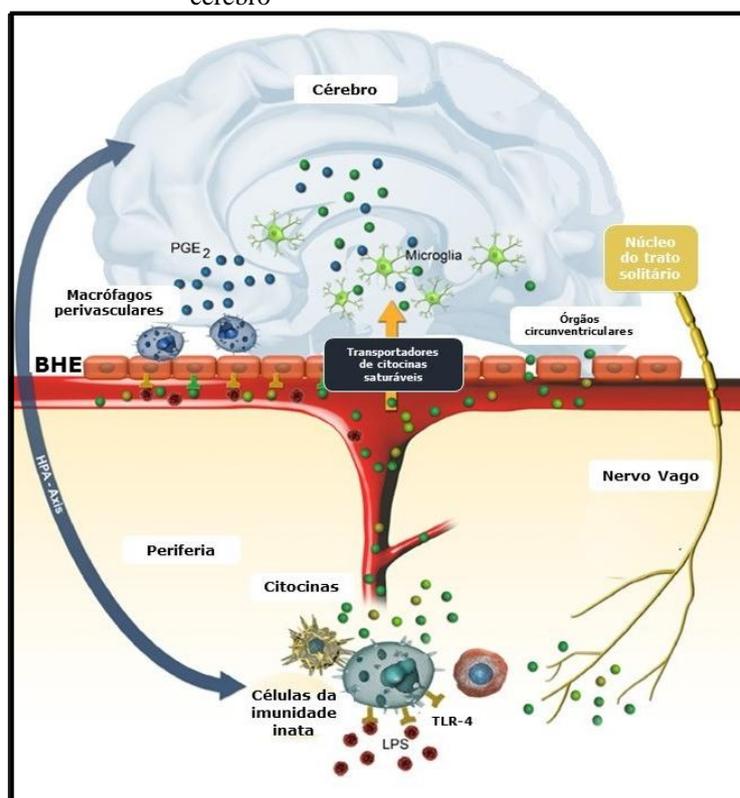
Nota: Secreção de citocinas por monócitos e neutrófilos circulantes e macrófagos teciduais pela exposição ao LPS. O LPS liga-se ao LBP, e o complexo recém-formado ativa diferentes células por ligação aos seus receptores CD14 e TLR4. O complexo LPS:LBP é eficaz em ativar células de origem mielóide (neutrófilos, monócitos, macrófagos e microglia), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-1, TNF e IL-6. Essas citocinas ligam-se a receptores cognatos, expressos na superfície de células que formam a BHE, mas não são essenciais para a mediação dos efeitos de LPS no SNC.

Uma vez ativado, o NF- κ B passa a transcrever genes que codificam diferentes mediadores pró-inflamatórios e oxidantes como: quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), óxido nítrico (ON), superóxido dismutase (SOD), ciclooxigenase (COX), prostaglandinas (PGs), interferons gama (IFN- γ) e citocinas pró-inflamatórias,

principalmente interleucina 1 beta (IL1- β), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (FLORES-MARTINEZ *et al.*, 2018; GALIC; RIAZI; PITTIMAN, 2012).

Estudos recentes apontam que o cérebro é um dos primeiros órgãos a ser afetado durante a sepse pelos PAMPs e pelos mediadores inflamatórios e oxidantes produzidos periféricamente. As citocinas, em especial, são as principais responsáveis por iniciarem a comunicação entre o sistema imune periférico e o sistema nervoso central (SNC) através de diferentes vias. Durante a sepse, as citocinas sinalizam o SNC pela ativação de nervos sensoriais periféricos (geralmente o nervo vago aferente) e pelos órgãos circunventriculares (CVOs) (Figura 3) (DAL-PIZZOL, TOMASI, RITTER, 2014; HUA-YEH *et al.*, 2018 SCHEDLOWSKI; ENGLER; GRIGOLEIT, 2014).

Figura 3 – Vias de comunicação entre o sistema imune e o cérebro



Fonte: Adaptado de SCHEDLOWSKI; ENGLER; RIGOLEIT, 2018.

Nota: O LPS interage com os receptores TLR, presentes na superfície de macrófagos e neutrófilos, levando à produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias na corrente circulatória. As citocinas interagem com o cérebro através de diferentes vias de sinalização: transportadores específicos presentes na BHE, pelos órgãos circunventriculares, via nervo vago e pelos os receptores TRL presentes nas células cerebrais.

A estimulação do nervo vago acontece pelo contato das citocinas periféricas com receptores axonais de citocinas, presentes nos seus terminais dendríticos. Esses receptores são responsáveis por captar os sinais inflamatórios e os enviar até o núcleo do trato solitário (tronco encefálico). Quanto aos CVOs, não existe proteção exercida pela barreira hematoencefálica (BHE) nessa região. Portanto, as citocinas periféricas atravessam livremente para o parênquima cerebral e disseminam os sinais inflamatórios no cérebro (Figura 3) (CHAUDHRY; DUGGAL, 2014; LIU *et al.*, 2017; REIS, 2018).

Uma vez presentes no cérebro, as citocinas induzem o aumento da expressão de receptores CD40, selectina e da molécula de adesão intracelular-1 em células do endotélio cerebral. A hiper-expressão dessas moléculas induz a perda da capacidade homeostática endotelial, levando ao aumento da passagem de líquido e proteínas para o cérebro e formação de edema tecidual. Por sua vez, o desequilíbrio do sistema de coagulação induz a formação de microtrombos e, conseqüentemente, a isquemia cerebral (COMIM *et al.*, 2008; DANIELSKY *et al.*, 2018; MOLNAR *et al.*, 2018; MALDONADO, 2013).

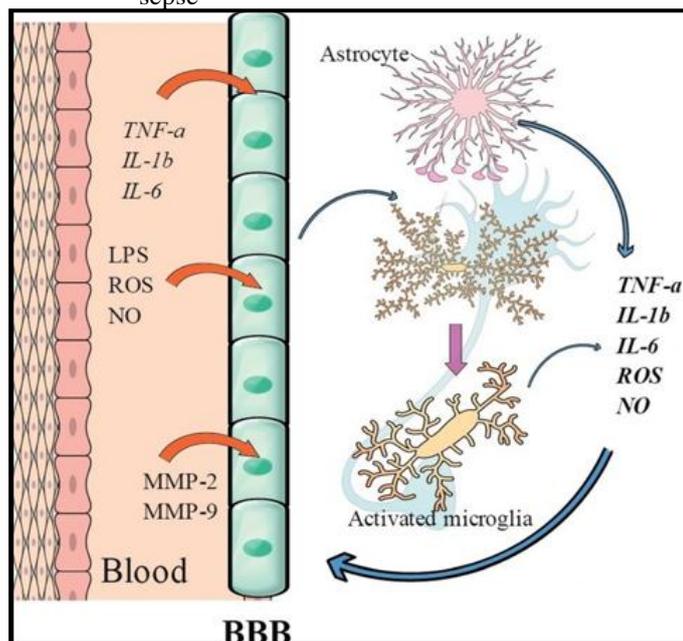
A exposição à isquemia e aos níveis aumentados de citocinas estimula as células vasculares cerebrais a expressarem glicoproteínas denominadas moléculas de adesão leucócito endotélio. Essa interação é responsável pela migração de células polimorfonucleadas e leucócitos ativados em direção à lesão, por um processo conhecido como diapedese. Durante o curso da sepse, é comumente visto o aumento da migração de leucócitos ativados em direção ao cérebro na tentativa de destruir os patógenos. Entretanto, essas células também são importantes fontes de produção de fatores oxidantes e, por isso, causam, ao mesmo tempo, danos ao tecido cerebral (INCE *et al.*, 2016; CZEMPIK; PLUTA; KRZYCH, 2020).

Consistentemente, as citocinas têm se mostrado relacionadas ao estresse oxidativo, os quais juntos modificam o funcionamento da BHE durante a sepse. O comprometimento da BHE pode ser observado por meio de alterações não disruptivas e disruptivas. As alterações não disruptivas ocorrem em níveis molecular e celular, as quais modificam a permeabilidade da BHE. Já as disruptivas, originam-se por meio de mudanças anatômicas da célula, como: degradação do glicocálice, perda de integridade das junções estreitas, dano mitocondrial, aparecimento de fenestras entre as células endoteliais e morte de células endoteliais, as quais induzem o rompimento da BHE (VERKRATSKY *et al.*, 2019; ADAM *et al.*, 2019; DANIELSKY *et al.*, 2018).

A perda da integridade da BHE é a principal razão para a origem da disfunção cerebral induzida pela sepse e para um dano sistêmico final. Estudos apontam que o aumento da atividade de proteínas que compõem a BHE, como as metaloproteinases de matriz (MMP), desloca as células endoteliais, contribuindo para o seu rompimento durante a sepse. A destruição da BHE gera distúrbios homeostáticos iônicos, levando à perda da sua seletividade e capacidade de impedir a entrada de componentes bacterianos (LPS) e mediadores inflamatórios e oxidantes oriundos da corrente circulatória (DALL-PIZZOL *et al.*, 2013; COMIM *et al.*, 2008; DAL-PIZZOL *et al.*, 2010; YOKOO *et al.*, 2012).

Há evidências de que as citocinas, as moléculas oxidativas e os peptídeos microbianos (PAMPs) por si só interagem com a BHE, alterando negativamente a sua permeabilidade 24 horas após a indução da sepse. A perda da integridade da BHE e a presença de fatores deletérios no cérebro ativam as células gliais via receptor TRL, as quais também iniciam o processo de produção e liberação de moléculas inflamatórias e oxidativas (Figura 4) (DALL-PIZZOL *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-GOMEZ *et al.*, 2020).

Figura 4 – Disfunção da barreira hematoencefálica durante a sepse



Fonte: Adaptado de DANIELSKY *et al.*, 2018.

Nota: O LPS à jusante com as citocinas IL1-β, IL-6, TNF-α e os mediadores oxidativos comprometem a integridade da BHE e, conseqüentemente, induzem o aumento da sua permeabilidade. Além disso, esses mediadores ativam as MMP 2 e 9, as quais quebram as junções entre as células que compõem a BHE. Diante disso, a BHE se rompe e perde a seletividade e a capacidade de impedir a entrada de moléculas estranhas no cérebro, deixando as células nervosas desprotegidas. A microglia e os astrócitos passam a produzir mediadores pró-inflamatórios e pró-oxidantes, na tentativa de proteger o cérebro dos danos gerados pela sepse. Contudo, a resposta celular acaba exacerbando a resposta inflamatória e contribuindo aos danos à BHE.

A produção de citocinas e moléculas oxidantes pelas células da glia normalmente constitui em um processo benéfico, cujo objetivo é manter a plasticidade cerebral e proteger o cérebro de ameaças potencialmente deletérias. No entanto, durante a sepse ocorre o descontrole da produção dos mesmos, levando à persistência da inflamação e do estresse oxidativo. Essa desregulação, por sua vez, gera um ciclo vicioso pelo aumento adicional de fatores nocivos ao cérebro, além de contribuir para o desenvolvimento de um quadro neuroinflamatório crônico e para a progressão do rompimento da BHE (DANIELSKY *et al.*, 2018; MORAES *et al.*, 2014; SIQUEIRA, 2016).

A BHE compreende em um sistema celular complexo e dinâmico, capaz de interagir com as células da glia (microglia e astrócitos). Os astrócitos, em especial, são células

morfologicamente complexas, caracterizadas por uma arborização intrincada e por especializações anatômicas que fornecem suporte estrutural e funcional para a BHE, sinapses neuronais, vasos sanguíneos e outras células presentes no SNC. Além disso, são consideradas células imunocompetentes, uma vez que atuam como reguladores importantes da inflamação cerebral. A participação dos astrócitos nos mecanismos ligados à neuroinflamação e quebra da BHE ocorre por meio de um processo denominado astrogliose (LINNERBAUER; WHEELER; QUINTANA, 2020; YANG. WANG, 2015).

A astrogliose é uma condição patológica caracterizada por alterações reativas do astrócito. A reatividade dos astrócitos está intimamente relacionada à sua morfologia, ao estado proliferativo, aos tipos de células com os quais interagem e à arquitetura do tecido para o qual está contribuindo. Com base nesses critérios, foram propostos dois subtipos fundamentalmente diferentes dessas células. O primeiro são os astrócitos reativos proliferativos e formadores de borda (A1), os quais encontram-se circundando o tecido danificado que contém infiltração de leucócitos, proliferação de células estromais e fibrose após trauma, isquemia, infecção, inflamação, acúmulo de toxinas, ruptura da BHE ou doença neurodegenerativa. O segundo subtipo é composto pelos astrócitos reativos não proliferativos (A2), que são aqueles que respondem à lesão ou doença mantendo as suas localizações e características fundamentais da estrutura celular, bem como as interações e funções no tecido neural que não está abertamente danificado (VERKHRATSKY *et al.*, 2019; SOFRONIEW, 2020).

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é a principal constituinte dos filamentos intermediários de astrócitos, e por isso é considerada como um dos marcadores específicos para astrócitos reativos. O aumento da sua expressão é frequentemente visto durante a sepse, pois está correlacionado ao aumento da síntese de mediadores pró-inflamatórios e oxidantes no cérebro. Além disso, a sua expressão aumentada está relacionada à formação de processos astrocíticos estendidos, os quais induzem a morte neuronal (MESSING; BRENNER, 2020; SOFRONIEW, 2015; PEKNY; PEKNA, 2014).

Fisiologicamente, a morte celular é um mecanismo homeostático altamente regulado e crucial para manter o funcionamento dos tecidos, tamanho dos órgãos e para conter os processos inflamatórios. A morte de neurônios desempenha um papel importante para a geração de circuitos funcionais, pois promove a eliminação de neurônios excessivos que migram para posições ectópicas ou que inervam alvos inadequados, além de reduzir a competição entre neurônios por quantidades limitantes de fatores pró-sobreviventes, como

o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), podendo assim atingir a inervação alvo ideal (FRICKER *et al.*, 2018).

Embora a remoção de neurônios excessivos no sistema nervoso seja essencial para a formação de circuitos funcionais, a morte anormal de células neuronais é uma das principais causas de doenças neurodegenerativas aguda e crônica. A neurodegeneração é caracterizada pela disfunção estrutural e funcional dos neurônios, as quais levam ao aumento progressivo da morte dos mesmos. Estudos demonstram que a morte exacerbada de neurônios coincide com a produção de mediadores pró-inflamatórios e oxidantes, que estão associados a resultados ruins em pacientes sépticos (GU *et al.*, 2020; KAYAGAKI *et al.*, 2011; HAGAR *et al.*, 2013; NAPIER *et al.*, 2016).

Sabe-se que as espécies reativas produzidas como parte dos processos fisiológicos diários têm papéis importantes na sinalização celular, transcrição gênica e resposta imune. Porém, quando superproduzidas, geram um dano oxidativo severo nas estruturas celulares. O acúmulo de ROS na matriz mitocondrial, por exemplo, induz a oxidação de lipídeos e proteínas da sua membrana, gerando uma disfunção mitocondrial. Além disso, distúrbios no DNA mitocondrial devido à oxidação por ROS estão intimamente correlacionados com uma menor expressão de genes responsáveis pela codificação de proteínas antioxidantes de proteção mitocondrial (LEO; CAMPOS, 2019).

Embora os mecanismos envolvidos ainda não sejam claros, foram identificadas 30 mutações no DNA mitocondrial relacionadas ao ambiente pró-oxidativo durante a sepse. A oxidação do DNA e as membranas mitocondriais, com sua subsequente fragmentação, implicam em lesão celular irreversível. Por fim, a morte mitocondrial e a diminuição da produção de adenosina trifosfato ativam sinais de morte celular que desencadeiam consequentemente processos pró-inflamatórios (LEO; CAMPOS, 2019; PISOSCHI *et al.*, 2015).

Foi demonstrado que o TNF- α e o ligante Fas estão relacionados à indução de apoptose de neurônios motores durante a inflamação sistêmica. A ligação de receptores de morte familiar do TNF- α , na superfície neuronal, culmina no recrutamento da proteína associada à Fas com domínio de morte (FADD). Essa ligação, por sua vez, recruta moléculas pró-caspase-8 permitindo o processamento autoproteolítico e ativação da caspase-8. Uma vez ativada, a caspase-8 estimula outras caspases efetoras por clivagem proteolítica, promovendo danos à mitocôndria e morte neuronal por apoptose (FRICKER *et al.*, 2018).

A sepse também induz apoptose neuronal pela via dependente de caspase-11. A caspase-11 é um receptor de reconhecimento de padrão citosólico, que desempenha um papel crítico na resposta ao LPS durante a sepse. Estudos mostraram, em diferentes tipos celulares, o aumento da expressão da caspase-11 após a detecção do LPS via TLR. O reconhecimento do LPS parece induzir a ativação da caspase-11 através da sua dimerização, levando à morte celular e liberação de mais mediadores pró-inflamatórios e oxidativos durante a sepse (AACHOUI *et al.*, 2013; BROZ; MONACK, 2011; RATHINAM *et al.*, 2012; NAPIER *et al.*, 2016; GU *et al.*, 2020)

Além disso, o estresse oxidativo gerado pela sepse desregula a expressão de proteínas importantes no mecanismo de indução e bloqueio de apoptose, como a família de proteínas Bcl. Essa família compreende em 18 membros classificados em três grupos conforme a sua função na apoptose. O primeiro grupo é composto pelas proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl1 e A1, que atuam suprimindo a morte celular pela ligação e inibição das proteínas Bcl pró-apoptóticas, ao passo que o segundo grupo é formado pelas proteínas efetoras pró-apoptóticas Bax e Bak, as quais promovem disfunção mitocondrial. Já as proteínas do terceiro grupo são altamente conservadas e heterogêneas, uma vez que evoluíram para detectar o estresse celular e iniciar a apoptose pela ativação direta de Bax e Bak ou pelo deslocamento de ativadores diretos das proteínas anti-apoptóticas (ADAM *et al.*, 2019; BLANCO *et al.*, 2017).

A homeostase e a dinâmica mitocondrial são reguladas especialmente pelas proteínas da família Bcl-2. Em células saudáveis, Bax e Bak se movem entre o citosol e a membrana externa mitocondrial (MOM), enquanto em condições como a sepse, onde as células gliais encontram-se hiperativas, Bax e Bak ficam acumuladas e oligomerizadas na MOM, gerando o aumento da sua permeabilidade. A alteração da permeabilidade da MOM, induz a liberação de fatores pró-apoptóticos como o citocromo *c* e a hiperatividade das proteínas que compõem o grupo 3 (BLANCO; GARCÍA-SÁEZ, 2017; EDLICH *et al.*, 2017).

O aumento da atividade das proteínas pró-apoptóticas ativa diferentes caspases e induz a diminuição da expressão de Bcl-2, culminando na morte de neurônios. Durante a sepse, a apoptose neuronal ocorre predominantemente pela desregulação das proteínas da família Bcl. Este desajuste aumenta a atividade das caspases clivadas, especialmente em regiões responsáveis pelos processos de atenção, linguagem e motivação, como o hipocampo (LUO *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2014a; ZHAGLOUL *et al.*, 2017).

Um estudo avaliando a apoptose e a vulnerabilidade de diferentes estruturas cerebrais induzidas por inflamação sistêmica concluiu que o hipocampo é a região mais frágil durante a sepse experimental. A presença de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo altera a regulação do cálcio (essencial para a condução dos estímulos nervosos) e aumenta a produção de radicais livres (tóxicos para as células nervosas), levando à morte progressiva dos neurônios (GASPAROTTO *et al.*, 2017; GASPAROTTO *et al.*, 2017; SEMMLER *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2018).

A perda das sinapses afeta proeminentemente a transmissão excitatória no hipocampo, induzindo o prejuízo das funções cognitivas. Foi demonstrado que o comprometimento cognitivo induzido pela sepse está associado à diminuição da neurogênese hipocampal. A sepse prejudica a proliferação e diferenciação das células-tronco neurais do hipocampo, afetando a reserva cognitiva e consequentemente a memória de longo prazo (SHEN *et al.*, 2020; STUART *et al.*, 2014; SEONG *et al.*, 2016; VALERO *et al.*, 2014).

Diversos trabalhos demonstraram consequências duradouras após a recuperação da sepse, incluindo alterações na memória, atenção, concentração e/ou perda global cognitiva. Além disso, evidências neuromorfológicas sugerem a associação destas alterações com a redução do volume hipocampal e da sua atividade elétrica em pacientes sobreviventes à sepse (BARICHELLO *et al.*, 2018; MANFREDIN *et al.*, 2019; PRESCOTT *et al.*, 2018).

Como evidenciado, a hipótese de que o prejuízo cognitivo pode estar relacionado aos processos inflamatório e oxidante, apesar de ser relativamente nova, é bastante consistente. Os distúrbios inflamatórios e do estado redox nas mitocôndrias têm sido considerados como os principais fatores desencadeadores de neurodegeneração e, consequentemente, do surgimento dos prejuízos cognitivos de curto e longo prazo em pacientes sobreviventes à sepse (BARICHELLO *et al.*, 2018; ANDONEGUI *et al.*, 2018; ZHANG., *et al.*, 2014a; BERDILI *et al.*, 2018; HERNANDES *et al.*, 2014; LEO; CAMPOS, 2019; XU *et al.*, 2017).

1.3 MEMÓRIA E COGNIÇÃO

A memória é caracterizada como uma habilidade do ser vivo de adquirir, reter e utilizar informações durante mecanismos associativos inconscientes, os quais são dependentes da capacidade do SNC modificar-se diante as experiências. Portanto, a memória é um processo fundamental para os seres vivos, especialmente para o ser humano, uma vez

que determina em grande parte a sua personalidade. Sem a memória, os humanos teriam apenas reflexos simples e comportamentos estereotipados (ALEXANDRE *et al.*, 2014; JONIDES *et al.*, 2008).

Os mecanismos envolvidos na formação da memória estão subdivididos em três etapas: aquisição, consolidação e evocação. A aquisição corresponde ao primeiro momento em que as principais informações são detectadas e selecionadas pelos sistemas sensoriais, ou seja, ocorre a exposição ao estímulo/experiência (imagem de um objeto, local, som, acontecimento, sequência de movimentos etc) (CAVALCANTE *et al.*, 2020; DUDAI, KARNI, BORN, 2015).

Já a etapa de consolidação, ocorre posteriormente ao primeiro contato com o estímulo/experiência a ser memorizado e acontece durante um período de tempo variável (minutos ou horas). As informações recém-adquiridas tornam-se estáveis por meio de uma série de transformações celulares, síntese proteica e modificações sinápticas necessárias para armazenar parte do que foi aprendido. Sendo assim, esta é uma fase considerada instável e sujeita a modulações uma vez que pode sofrer interferência de diversos fatores, como inflamatórios e oxidantes. E por fim, a etapa de evocação corresponde ao momento em que as informações anteriormente aprendidas e armazenadas são recuperadas e utilizadas (BIFF *et al.*, COMIN *et al.*, 2015; FANG *et al.*, 2013; SOUZA, 2020).

Em humanos, a memória distingue-se em diferentes tipos, podendo ser explícita ou implícita. As memórias explícitas são referidas como uma lembrança consciente de experiências anteriores. A mesma está subdividida em eventos que são vivenciados pessoalmente (relacionados a eventos) e em memórias que se referem a fatos e conhecimentos (português, história, geografia, matemática etc.). Quanto às memórias implícitas, referem-se às lembranças inconscientes como habilidades motoras adquiridas (andar de bicicleta, nadar, tocar violão etc.) e associações emocionais com estímulos ou eventos particulares que formam o gosto e desgosto por algo (NEVES, 2020).

As memórias também podem ser classificadas quanto ao tempo de retenção (armazenamento), sendo divididas em: memórias de trabalho, curta ou longa duração. A memória de trabalho refere-se à informação mantida por alguns segundos, a qual é processada basicamente pela atividade elétrica da região do córtex pré-frontal, sem deixar traços bioquímicos. A memória de curta duração (STM) é dependente da atividade de enzimas presentes no hipocampo e córtices entorrinal e perirrinal, por isso dura em média de 1 a 6 horas. Já a memória de longa duração (LTM) depende de diversas áreas cerebrais

como hipocampo, amígdala, cerebelo, septo, estriado e diferentes regiões corticais permitindo um maior tempo de armazenamento (de 6 horas até dias, meses ou anos) (NORRIS, 2017).

No que diz respeito aos roedores, as memórias explícita e implícita são classificadas conforme a sua ocorrência, podendo ser associativa ou não associativa. A memória associativa é inevitável do ponto de vista animal. Isso ocorre porque o ambiente é organizado de forma a permitir que certa resposta do animal seja necessária para obter algum resultado. Já a memória não associativa está relacionada à promoção de associações entre estímulos e respostas ou entre dois estímulos. A partir desses estímulos, os animais aprendem a prever eventos futuros para expressar um comportamento adequado e antecipatório (DIHEL, 2010; CASTILLO-DÍAZ *et al.*, 2017)

Assim, enquanto as tarefas de reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris avaliam o aprendizado associativo de reconhecimento visual e espacial, respectivamente, a habituação ao campo aberto avalia a memória não associativa (Figura 5). Embora haja uma classificação das memórias tanto em humanos quanto em animais, há uma sobreposição entre os diferentes tipos e subtipos (NEVES, 2020)

Figura 5 – Principais tarefas de avaliação da memória e cognição em roedores



Fonte: NEVES, 2020.

Nota: A memória e cognição em roedores são divididas em memórias explícitas e implícitas e ambas podem ocorrer por associação ou não.

Tratando-se dos processos neurobiológicos da memória, não há total compreensão de como os eventos bioquímicos e potenciais elétricos interagem para a formação da rede de imagens e sensações, as quais experienciamos ao acessarmos a memória. Sabe-se que o processo de aprendizagem é iniciado no hipocampo pela estimulação de neurônios

glutamatérgicos. E que os neurotransmissores acetilcolina, noradrenalina e dopamina participam do processo de consolidação da memória, uma vez que atuam como importantes moduladores de neurônios glutamatérgicos (CASTILLO-DÍAZ *et al.*, 2017).

A estimulação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no hipocampo induz a entrada de sódio e cálcio no neurônio, os quais são adicionados ao cálcio intracelular. Em consequência disso, há a ativação da proteínquinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII) e fosforilação de diversas proteínas de membrana. Além disso, o influxo de cálcio promove a ativação da proteínquinase dependente de adenosina 1'5' monofosfato cíclico (cAMP), o qual é somado aos efeitos da proteínquinase dependente de estímulos extracelulares (ERK). Dessa forma, as subunidades catalíticas CaMKII, cAMP e ERK podem migrar para o núcleo e ativar fatores de transcrição de proteínas ligantes ao elemento cAMP, como a proteína ligadora ao elemento cAMP (CREB), contribuindo para o início da consolidação da memória (IZQUIERDO., *et al.*, 2006; NEVES, 2020).

Em nível celular, a composição estrutural do hipocampo permite a integração de informações adquiridas de diversos sistemas cerebrais. Foi evidenciado que o hipocampo anterior codifica preferencialmente informações de ordem superior, construindo a essência da memória, enquanto o hipocampo posterior codifica preferencialmente informações espaciais e sensório-motoras de ordem inferior, registrando os detalhes de memória (POPPENK *et al.*, 2008; LISMAN *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2020).

Estudos mostram que as informações chegam no hipocampo pela região do giro denteado através da via perforante, atingindo posteriormente o corno de Ammon 3 (CA3) pelas fibras mugosas (Mossy). Por sua vez, a região CA3 conecta-se com o corno de Ammon 1 (CA1) pelos colaterais de Schaffer, os quais emitem projeções para o subículo (importante via de saída hipocampal), caracterizando o fim do circuito (KESNER, 2007; SILVA, 2020; ZHAO *et al.*, 2006).

Embora trabalhos anteriores tenham se concentrado nas contribuições dos neurotransmissores e circuitos neurais para o processo de formação e consolidação de memória, um novo estudo desenvolvido por Kol *et al.* (2020) revelou que os astrócitos também desempenham papéis modulatórios cruciais durante os processos cognitivos, incluindo a formação da memória. Atualmente há um amplo reconhecimento de que estas células podem sentir e modular a atividade do circuito neural e, portanto, contribuir crucialmente para o processamento de informações no cérebro.

Isso foi explicado devido a capacidade dos astrócitos em modular seletivamente os neurônios da região CA1 do hipocampo que se projetam para o córtex cingulado anterior e não outros alvos de projeção. Ademais, os astrócitos são capazes de expressar um repertório de receptores, transportadores e outras moléculas que permitem-lhes detectar uma infinidade de mediadores sinápticos, citocinas, prostaglandinas, sinais relacionados a mudanças nas concentrações iônicas locais, pH e os estados imune e redox. Essas células possuem ainda uma maquinaria de produção de uma variedade de moléculas que atuam nas sinapses incluindo o neurotransmissor glutamato, receptor NMDA, ATP e seu agente catabólico adenosina, agentes metabólicos como o L-lactato e outros fatores solúveis ou de contato que participam da formação, estabilização e eliminação de conexões sinápticas (SANTELLO; TONI; VOLTERRA, 2019).

Adicionalmente, foi evidenciado que, em respostas à neurotransmissores, os astrócitos regulam a força das conexões sinápticas liberando gliotransmissores nas sinapses tripartites. Sabe-se que mudanças na força sináptica entre neurônios co-ativados são consideradas importantes para o processo de formação da memória. Isso sugere que as intervenções que prejudicam a função dos astrócitos podem ter impacto na memória. (FRANKLAND; JOSSELYN, 2020).

A modulação astrocítica da atividade de rede e da cognição sofre transformações deletérias em tais estados inflamatórios. Em um modelo experimental de encefalite autoimune de esclerose múltipla, observou-se que a sinalização dependente de TNF- α produzido por astrócitos causou prejuízos cognitivos semelhantes aos observados em humanos. Além disso, foi demonstrado que camundongos com encefalite autoimune de esclerose múltipla apresentaram aumento significativo de TNF- α no hipocampo dorsal, modificando a longo prazo a duração da neurotransmissão excitatória e a memória contextual (HABBAS *et al.*, 2015; SANTELLO; TONI; VOLTERRA, 2019).

A ideia de que os astrócitos integram as funções neuronais em níveis sinápticos e de rede para influenciar o comportamento cognitivo é bastante consistente. Particularmente porque essas células comportam-se de formas diferentes diante de diferentes estímulos, característica, essa, denominada neuroplasticidade. A neuroplasticidade é definida como a capacidade do sistema nervoso de reorganizar sua estrutura, função e ligações em resposta a estímulos extrínsecos ou intrínsecos (MOURÃO JÚNIOR; FARIA, 2015).

A plasticidade neuronal em roedores foi bem documentada durante as últimas décadas, enquanto no cérebro humano permanece em grande parte indireta, principalmente

devido a limitações metodológicas e restrições éticas. A neuroplasticidade inclui diferentes mecanismos, entre eles a formação de neurônios recém-nascidos em áreas proliferativas como o hipocampo e a participação nos mecanismos de formação e consolidação da memória (D'AMATO; SPERANZA; VOLPICELLI, 2020)

O BDNF é um dos fatores neurotróficos mais estudados e bem caracterizados no SNC. Além de estar intimamente envolvido com a neuroplasticidade, estudos apontam a sua participação nos processos de aquisição e consolidação da memória. Além de estar presente em elevadas quantidades em neurônios glutamatérgicos e astrócitos hipocampais, o BDNF é essencial para a localização e manejo de tarefas simples do dia a dia, como reconhecer rostos familiares, lugares visitados e saber o caminho de volta para a casa (AMATO; SPERANZA; VOLPICELLI, 2020; SEKERES; WINOCUR; MOSCOVITCH, 2018; TINTORELLI *et al.*, 2020, TROMBETTA *et al.*, 2020).

Pang *et al.* (2004) sugeriram um papel para o BDNF na fisiopatologia de doenças associadas ao cérebro, como a doença de Alzheimer (DA). Foi evidenciado que os prejuízos na sinalização do BDNF contribuem substancialmente para a patogênese da DA. Em alguns casos, os níveis de BDNF correlacionaram-se com a gravidade da doença, apontando para uma ligação patogênica entre BDNF e AD.

Vários aprendizados dependentes do hipocampo, incluindo a extinção do medo, são acompanhados por alterações no mRNA do BDNF e no processamento de proteínas, exigindo ótimos níveis endógenos dessa neurotrofina para formar memórias estáveis. Estudos mostraram que a memória de reconhecimento aumenta a liberação de BDNF e ativa ERK2 na região do giro dentado do hipocampo (BEKINSCHETEIN; CAMMAROTA; MEDINA, 2013; CALLAGHN; KELLY, 2012).

A infusão de anticorpos bloqueadores de função anti-BDNF na região CA1 do hipocampo, após os treinamentos de reconhecimento de objetos e espacial, mostrou dificultar a retenção das memórias de reconhecimento e espacial. Entretanto, ambos os treinamentos parecem aumentar fisiologicamente os níveis de BDNF nessa região, de forma dependente dos receptores β -adrenérgicos e nNOS. Além disso, a deleção específica do gene de BDNF no hipocampo parece prejudicar o reconhecimento de novos objetos, bem como o da aprendizagem espacial no teste de labirinto aquático de Morris (CALLAGHN; KELLY, 2012; FURINI *et al.*, 2010; HELDT *et al.*, 2007).

A hipótese de que os processos inflamatórios crônicos regulam negativamente a liberação de BDNF culminando em níveis reduzidos do mesmo no cérebro e no sangue e em

déficits cognitivos, apesar de ser relativamente nova, é bastante consistente. Prakash e Kumar (2014) mostraram em ratos injetados com placas beta-amilóides (A β) no hipocampo, uma diminuição notável no nível de BDNF e aumento nos níveis de TNF- α , IL-6 e caspase-3, três semanas após a injeção intracerebroventricular. Essas mudanças foram associadas à incapacidade de retenção de memória espacial no teste de labirinto aquático de Morris.

Além disso, outros estudos envolvendo inflamação sistêmica também evidenciaram prejuízos cognitivos em animais sobreviventes à sepse. Huang *et al.* (2014) evidenciaram em ratos *Sprague-Dawley* submetidos à cirurgia de ligação e perfuração cecal (CLP) uma deficiência cognitiva na tarefa de reconhecimento de objetos, 24 horas após a indução da sepse. Além disso, foi relatado em ratos sobreviventes à sepse um aumento substancial de TNF- α no líquido cefalorraquidiano e de apoptose de neurônios hipocampais.

Moraes *et al.* (2014) mostraram, em camundongos sobreviventes à sepse induzida por CLP, um comprometimento da memória de longa duração no teste de reconhecimento de objetos, bem como uma redução da sinalização sináptica e excitatória no hipocampo nove dias após a cirurgia. Esses achados foram correlacionados ao envolvimento da ativação das células gliais pela inflamação sistêmica, pois foi evidenciado a elevação de 85% da imunorreatividade de GFAP e o aumento de 80% da estrutura morfológica microglial no hipocampo dos animais.

Como mencionado, as citocinas inflamatórias e os fatores oxidantes encontram-se super-expressos durante a sepse, o que culmina na redução da expressão de BDNF, plasticidade e senescência neuronal em estruturas cerebrais relacionadas à cognição. Neste sentido, parece crucial a investigação de compostos bioativos capazes de modular diferentes vias de sinalização para desempenhar a função neuroprotetora diante da sepse (GIACOBBO *et al.*, 2019; LEAL; BRAMHAM; DUARTE, 2017).

1.4 CURCUMINA

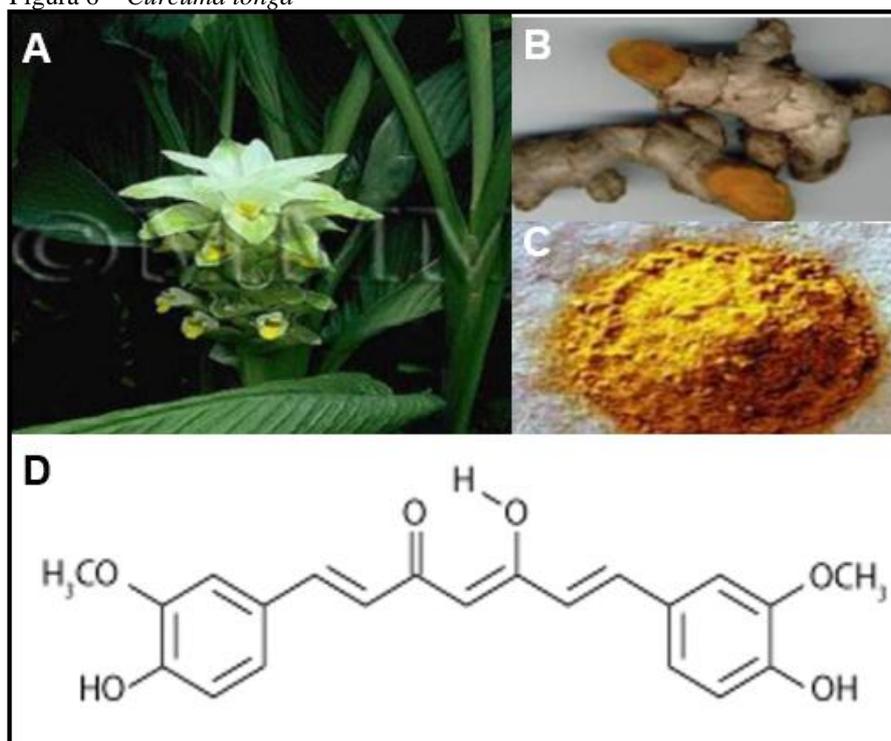
Como mencionado nos capítulos acima, a inflamação e o estresse oxidativo podem estar subjacentes a alguns aspectos neurodegenerativos. Até o momento, a maioria dos tratamentos disponíveis para esse fim tratam apenas os sintomas cognitivos advindos da morte neuronal. Muitas pesquisas têm sido destinadas a reduzir os efeitos inflamatórios e oxidativos da neurodegeneração, a fim de retardar o início da demência. Por isso, compostos

anti-inflamatórios e antioxidantes potencialmente acessíveis ao cérebro podem fornecer os meios para implementar essa estratégia terapêutica de adiar o aparecimento de prejuízos da memória e cognição, atuando como agentes neuroprotetores (CHO *et al.*, 2020; DAI *et al.*, 2016; MAZZANTI; GIACOMO, 2016; SERAFINI *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2018).

Por definição, a neuroproteção é um efeito que pode culminar em recuperação ou regeneração do SNC incluindo as suas células, estruturas e função. Embora existam diversas linhas de evidência apoiando a hipótese de que a neuroproteção possa ser um alvo farmacológico viável e prático, poucos compostos eficazes e seguros foram descobertos e/ou desenvolvidos para tal aplicação clínica (SCAPAGNINI, 2011).

Diante disso, os suplementos dietéticos, nutracêuticos e alimentos funcionais ganharam popularidade mundialmente significativa nas últimas décadas, devido ao aumento do interesse em produtos naturais e seus potenciais alvos terapêuticos, incluindo o neuroprotetor. Considerado um alimento funcional, ou seja, com propriedades que vão além do seu valor nutricional, a propriedade neuroprotetora da *Cúrcuma longa* (Açafrão da Terra) tem sido amplamente investigada (REIS, 2018; KHOTA; LUTHRIA, 2019).

O Açafrão da Terra, popularmente conhecido como cúrcuma ou curcumina, é uma planta rizomatosa pertencente à família do gengibre (*Zingiberaceae*) encontrada em regiões chuvosas e quentes de países como: Indonésia, Índia, China, Jamaica, Peru e Brasil. A curcumina [1,7-bis(4-hid roxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5,diona] é o principal composto fenólico natural e não tóxico presente no rizoma da raiz do Açafrão da Terra (Figura 6), pois é o local onde contém a maior concentração de substâncias responsáveis pelo seus potenciais anti-inflamatório, anti-oxidante, anti-apoptótico, neuroprotetor, anticancerígeno, cardioprotetor, hepatoprotetor entre outros (Figura 6) (AGGARWAL *et al.*, 2003; JAYAPRAKASHA *et al.*, 2002; KARIMI *et al.*, 2019; LERI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2014b).

Figura 6 – *Cúrcuma longa*

Fonte: Adaptado de REIS, 2018.

Nota: Em A, a planta *Cúrcuma longa* com flor. Em B, a raiz cortada. Em C, a raiz moída em forma de pó. Em D, a representação da estrutura química da curcumina.

Embora os potenciais terapêuticos da curcumina sejam amplos, esse composto possui uma baixa biodisponibilidade (com tempo de meia-vida curto no trato gastrointestinal) e perfil farmacocinético pobre. Por isso, são necessários vários dias de administração via oral para avaliar o efeito desejado. A sua degradação ocorre por meio de duas vias: solvólise e fotodegradação. A solvólise envolve a substituição ou eliminação nucleofílica por moléculas de solvente na parte cetona α,β -insaturada da curcumina. Em tampão alcalino aquoso, a solvólise da cadeia de heptadienona resulta em 90% da sua degradação, formando vanilina, ácido ferúlico, aldeído ferúlico e outros produtos. Já a fotodegradação foi sugerida após a observação da rápida remoção de manchas de cúrcuma quando expostas à luz solar. A degradação fotoquímica desse composto ocorre na sua forma sólida e solubilizada em aldeído ferúlico, vanilina e nos ácidos ferúlico e vanílico (KOTHA; LUTHRIA, 2019).

O metabolismo da curcumina ocorre principalmente por redução e conjugação. A redução da curcumina ocorre principalmente através das ligações duplas da cadeia de heptadienona para formar di-, tetra- e octa-hidrocurcumina, a qual é facilitada pelas enzimas redutase dependente de NadpH , álcool desidrogenase e microsomal (ainda não

identificada). Já a conjugação acontece principalmente no oxigênio fenólico da curcumina por meio de reações enzimáticas de glucuronidação e/ou sulfonação, sendo essas as principais vias metabólicas do organismo. A conjugação por glucuronidação ocorre por meio da reação de catálise mediada pela UDP-glucuronosiltransferase, enquanto a sulfonação ocorre pela catálise das isoenzimas de fenol sulfotransferase humana SULT1A1 e SULT1A3 (KOTHA; LUTHRIA, 2019).

A curcumina possui a capacidade de modular múltiplos alvos biológicos e demonstrou exibir atividade pleiotrópica contra diversas doenças, incluindo a sepse e danos cognitivos. Um estudo epidemiológico realizado por Chandra *et al.* (2001) sugeriu que a curcumina, um dos compostos nutricionais e medicinais mais prevalentes utilizados pela população indiana, é responsável pela incidência significativamente menor de Doença de Alzheimer (DA) na Índia em comparação com os Estados Unidos da América. Consistente com esses dados, Cole *et al.* (2007) demonstraram, em um modelo de camundongo transgênico para DA (Tg2576) tratado com curcumina durante 6 meses consecutivos, a supressão dos índices de inflamação, oxidação e dos déficits cognitivos induzidos por A β (SCAPAGNINI *et al.*, 2011).

Baghbaderani *et al.* (2020) mostraram, em ratos submetidos a cirurgia de ligadura do ducto biliar (BDL), um prejuízo significativo das memórias espacial e de referência, em relação ao grupo Sham no teste de labirinto aquático de Morris. Porém, ao submeter os animais BDL ao tratamento intraperitoneal com curcumina (40 mg/kg) durante 4 semanas, observou-se a melhora de ambas as memórias testadas. Além disso, o tratamento com curcumina foi capaz de aumentar a expressão do gene Bcl-xL (responsável por aumentar a senescência celular), dos genes 1 α do receptor γ ativado por proliferação de peroxissoma (PGC-1 α) e fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) (envolvidos na função mitocondrial), bem como diminuir o nível de expressão do gene pró-apoptótico Bcl-2 no hipocampo de ratos BDL.

Khan *et al.* (2019) exploraram em ratos *Wistar* machos o efeito neuroprotetor do tratamento intraperitoneal (i.p) crônico com curcumina (300 mg/kg) sobre a inflamação crônica induzida por LPS (250 μ g/kg, i.p). Nesse estudo, notou-se a prevenção do estresse oxidativo acompanhado da melhora da memória espacial nos labirintos aquático de Morris e em Y. Os achados foram correlacionados à capacidade da curcumina em prevenir os efeitos neurodegenerativos causados pelo desafio imunológico com LPS, uma vez que a via de sinalização JNK/NF κ B apresentou-se regulada, levando à diminuição dos níveis de ROS,

peroxidação lipídica e da morte de neurônios hipocâmpais quando comparado ao grupo controle.

Bassani *et al.* (2017) demonstraram em um modelo de DA, cujos ratos receberam o tratamento crônico por gavagem (v.o) com curcumina (50 ou 100 mg/kg), uma melhora significativa da memória de reconhecimento no teste de reconhecimento de objetos. Corroborando esse estudo, Sundaram *et al.* (2017) também evidenciaram uma melhora do prejuízo cognitivo no teste de reconhecimento de objetos em camundongos transgênicos para DA tratados por gavagem (p.o) com curcumina (40 mg/kg) por 12 semanas. Segundo os autores, a melhora da memória de reconhecimento está possivelmente correlacionada à redução da inflamação e da progressão dos depósitos de placas β -amilóide e p-tau em animais tratados com esse composto quando comparada ao grupo controle.

Vachharajani *et al.* (2010) evidenciaram uma intensa disfunção da BHE em animais sobreviventes à sepse induzida por CLP, em relação ao grupo Sham. Contudo, ao pré-tratar os animais CLP com curcumina (10 mg/kg, p.o) durante 2 dias consecutivos, observou-se uma prevenção do extravasamento da BHE. Segundo os autores, a prevenção da disfunção da BHE pode estar relacionada ao aumento da expressão de p-selectina em diferentes leitos vasculares e à diminuição da adesão leucocitária e plaquetária na microcirculação cerebral, o que pode ter reduzido a intensidade do estresse inflamatório e oxidativo durante a sepse.

Complementarmente, Akinyemi *et al.* (2018) demonstraram a participação da curcumina no sistema colinérgico em ratos submetidos ao tratamento com cádmio. Foi observado um aumento significativo dos níveis de expressão de mRNA da enzima acetilcolinesterase (AChE) e da sua atividade no córtex cerebral em resposta ao tratamento com cádmio. No entanto, o co-tratamento por gavagem com curcumina nas doses de 25 ou 50 mg/kg foi capaz de inibir o aumento da atividade da AChE e da expressão do seu mRNA, quando comparado ao grupo controle.

Frente ao exposto, é possível sugerir que a curcumina pode ser um potencial agente terapêutico para prevenir os prejuízos cognitivos oriundos da sepse, uma vez que este composto é capaz de combater os efeitos inflamatórios e oxidativos. Por isso, o nosso trabalho faz-se importante, pois não há na literatura dados consistentes que abordam conjuntamente a ação da curcumina sobre os déficits cognitivos junto aos danos oxidativos em animais sobreviventes à sepse. Tomando em conjunto todos os modelos de estudo demonstrados, hipotetizamos que o tratamento crônico com curcumina atenuará os déficits

cognitivos e o estresse oxidativo induzidos pela inflamação sistêmica em modelo de animais sobreviventes à sepse induzida por ligação e perfuração cecal.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho seguem descritos abaixo.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento com curcumina sobre os déficits cognitivos e neurodegenerativos em ratos sobreviventes à sepse.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Simular a sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal;
- b) Investigar em animais sobreviventes à sepse induzida por ligação e perfuração cecal, após 10, 20 e 30 dias, alterações comportamentais nos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris.
- c) Avaliar o efeito do tratamento com curcumina (50 mg/kg, p.o) em animais sobreviventes à sepse e expostos, após 10 dias, aos testes comportamentais de campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris;
- d) Avaliar o efeito do tratamento com curcumina (50 mg/kg, p.o) em animais sobreviventes à sepse, após 10 dias, sobre os parâmetros oxidantes nitrosilação proteica (NO), TBARS e fluorescência de lucigenina (ROS);
- e) Avaliar o efeito do tratamento com curcumina (50 mg/kg, p.o) em animais sobreviventes à sepse, após 10 dias, sobre os parâmetros antioxidantes Trap, GSH (total e livre) e GSSG.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos adultos machos (6 semanas) da linhagem *Wistar*, pesando entre 200 e 300g, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas-MG. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento (ração peletizada normoproteica) e foram mantidos à temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$, em fotoperíodo definido de 12 horas, com as luzes acesas às 7h. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Alfenas.

3.2 SUBSTÂNCIAS

- a) Quetamina e Xilazina (Distribuidora de Produtos Farmacêuticos Valle Med Ltda) administradas em conjunto via intraperitoneal (i.p);
- b) Pentabiótico (Ford Dodge Saúde Animal LTDA) administrado via intramuscular (i.m);
- c) Tramadol (Distribuidora de Produtos Farmacêuticos Valle Med Ltda) administrado via subcutânea (s.c) durante 2 dias consecutivos;
- d) Solução fisiológica 0,9% (Isofarma) administrada intraperitonealmente;
- e) Álcool 70% e Clorexidina 0,2% (Isofarma) utilizados para assepsia;
- f) Curcumina (Sigma, Brasil) suspensa em carboximetilcelulose 0,5% e administrada por gavagem durante 7 dias consecutivos.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

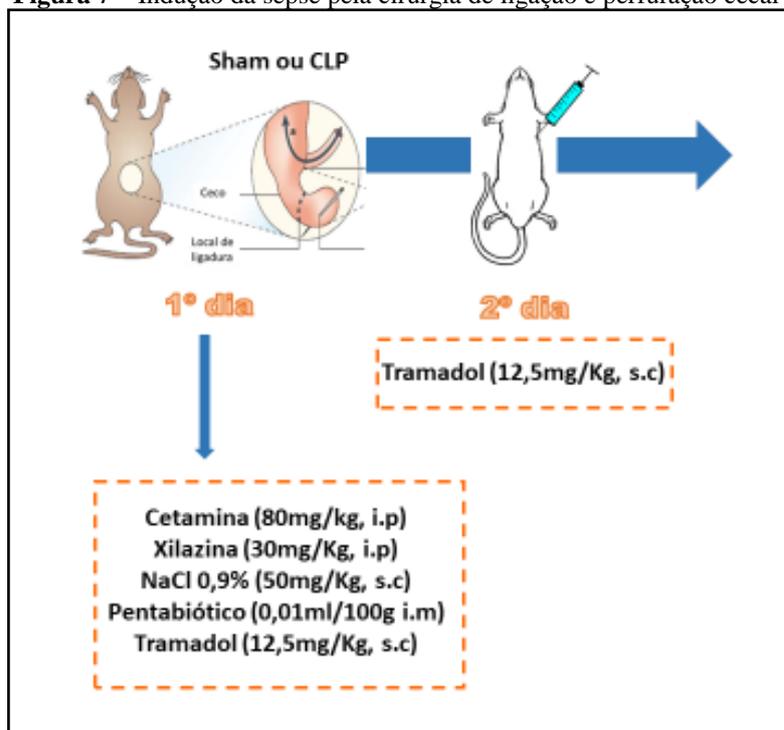
Descreveremos a seguir os protocolos experimentais utilizados em nosso estudo.

3.3.1 Indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal

Para induzir a sepse por CLP, os animais foram inicialmente analgesiados com tramadol (12,5 mg/kg, s.c). Após um período de 5 a 10 minutos, os mesmos foram

anestesiados intraperitonealmente com quetamina (80 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg) (administradas conjuntamente). Após total sedação, os animais foram submetidos à simulação ou indução da sepse por ligação e perfuração cecal. Imediatamente após o término da cirurgia, os animais receberam as doses de solução fisiológica 0,9% (50 mg/kg, i.p) e pentabiótico (0,01 ml/100g, i.m). Além disso, 24 horas após a cirurgia, uma nova dose de tramadol (20 mg/kg, s.c) foi administrada. (Figura 7).

Figura 7 – Indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal



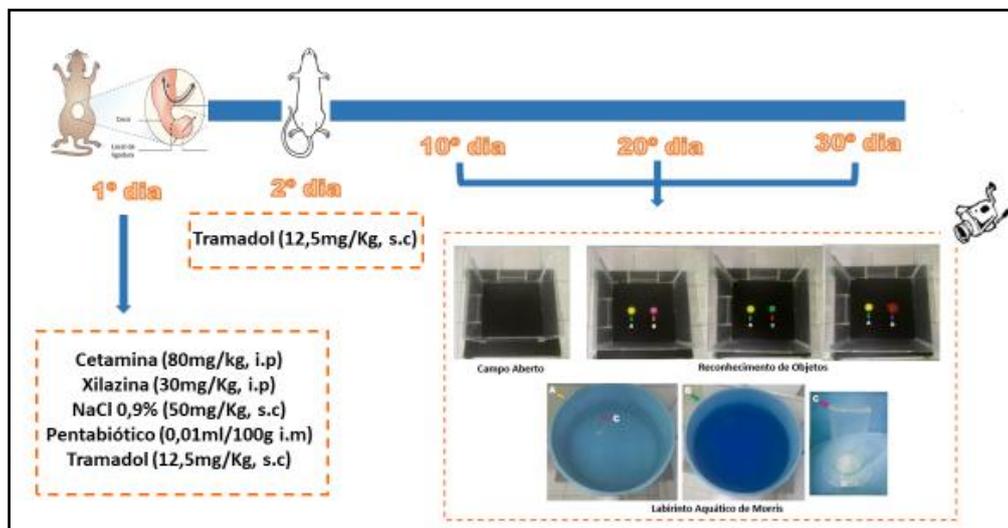
Fonte: Autora.

3.3.2 Primeira Etapa - Avaliação temporal do efeito da sepse sobre o comportamento cognitivo em animais sobreviventes à sepse

A primeira etapa do presente estudo objetivou determinar o dia do tratamento com curcumina mais conveniente para investigar o seu efeito sobre as possíveis alterações cognitivas induzidas pela sepse. Inicialmente, dividimos aleatoriamente os animais Sham (controle) e CLP (sépticos) em três grupos distintos: 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal. Posteriormente, elaboramos uma curva temporal submetendo-os aos testes comportamentais de campo aberto, reconhecimento de

objetos e labirinto aquático de Morris. Cabe ressaltar que utilizamos os mesmos animais para os testes de campo aberto e reconhecimento de objetos (Figura 8).

Figura 8 - Efeito temporal da sepse (10, 20 e 30 dias) sobre o desempenho comportamental nos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris em animais Sham e CLP



Fonte: Autora.

Dessa forma, foram compostos 6 grupos experimentais como descritos no Tabela 1.

Tabela 1 – Grupos experimentais (animais Sham e CLP) 10, 20 ou 30 dias após a cirurgia de ligação e perfuração cecal

Grupos	Dias após a CLP	Número de animais por grupo
Sham	10	10
CLP	10	10
Sham	20	10
CLP	20	10
Sham	30	10
CLP	30	10

Fonte: Autora.

3.3.3 Segunda etapa: Avaliação do efeito do tratamento com curcumina sobre as alterações cognitivas e o estresse oxidativo em animais submetidos à cirurgia de ligação e perfuração cecal

A segunda etapa do presente trabalho objetivou investigar o efeito do tratamento com curcumina sobre os déficits cognitivos e o estresse oxidativo induzidos pela sepse. Para isso, avaliamos os resultados obtidos na curva temporal realizada anteriormente e determinamos o 10º dia após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal como o dia mais apropriado para avaliar os efeitos do tratamento com curcumina. Dessa forma, foram compostos quatro grupos experimentais como descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Grupos experimentais (tratamento com curcumina / Sham ou CLP) 10 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal

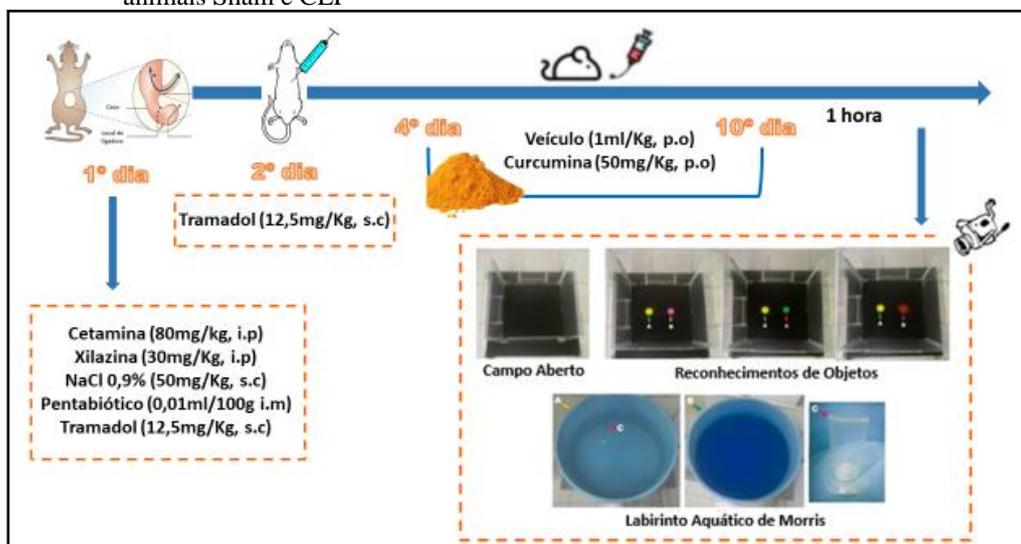
Grupos	Tratamento	Número de animais por grupo
Sham	Veículo (1 ml/kg)	10
CLP	Veículo (1 ml/kg)	10
Sham	Curcumina (50 mg/kg)	10
CLP	Curcumina (50 mg/kg)	10

Fonte: Autora.

3.3.3.1 Avaliação do efeito do tratamento com curcumina sobre o comportamento cognitivo em animais sobreviventes à sepse induzida por ligação e perfuração cecal

Os animais Sham e CLP receberam veículo (1 ml/kg) ou curcumina (50 mg/kg) por gavagem, por um período de 7 dias consecutivos a partir do quarto dia após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal, às 07h30. Uma hora após o último dia de tratamento (08h30), ou seja, 10 dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris. Cabe ressaltar que utilizamos os mesmos animais para os testes de campo aberto e reconhecimento de objetos (Figura 9) (REIS *et al.*, 2022).

Figura 9 - Efeito do tratamento com curcumina sobre o desempenho comportamental nos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris em animais Sham e CLP

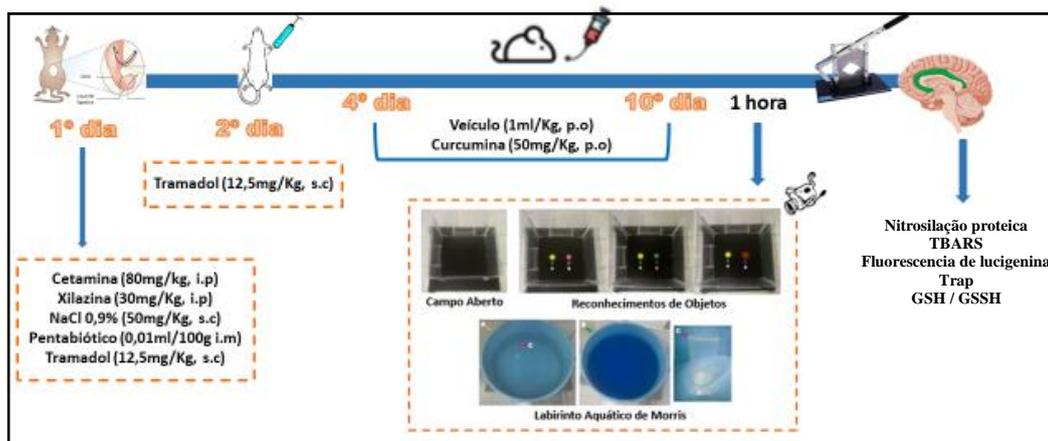


Fonte: Autora.

3.3.3.2 Avaliação do efeito do tratamento com curcumina sobre o estresse oxidativo em animais sobreviventes à sepse induzida por ligação e perfuração cecal

Imediatamente após o término dos testes comportamentais de campo aberto e reconhecimento de objetos, os animais Sham e CLP tratados através de gavagem durante 7 dias consecutivos com veículo (1ml/Kg) ou curcumina (50mg/Kg), foram sacrificados e os hipocampus direito e esquerdo foram dissecados e armazenados em *ependorfs*. Os hipocampus foram posteriormente destinados à avaliação do estresse oxidativo pelas técnicas fluorescência relativa de lucigenina (nível de ROS) e captura de resíduos S-nitrosotióis (SNO-RAC), a qual permitiu-nos investigar a porcentagem de nitrosilação proteica (NO). Também foi avaliada a capacidade antioxidante total de retenção de radicais (trap), TBARS (metabólito produzido durante a oxidação de ácidos graxos), GSH (glutathiona) total e livre, GSSG (glutathiona oxidase) (Figura 10).

Figura 10 - Efeito do tratamento com curcumina sobre o estresse oxidativo em animais Sham e CLP



Fonte: Autora.

3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

A seguir, descreveremos os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo.

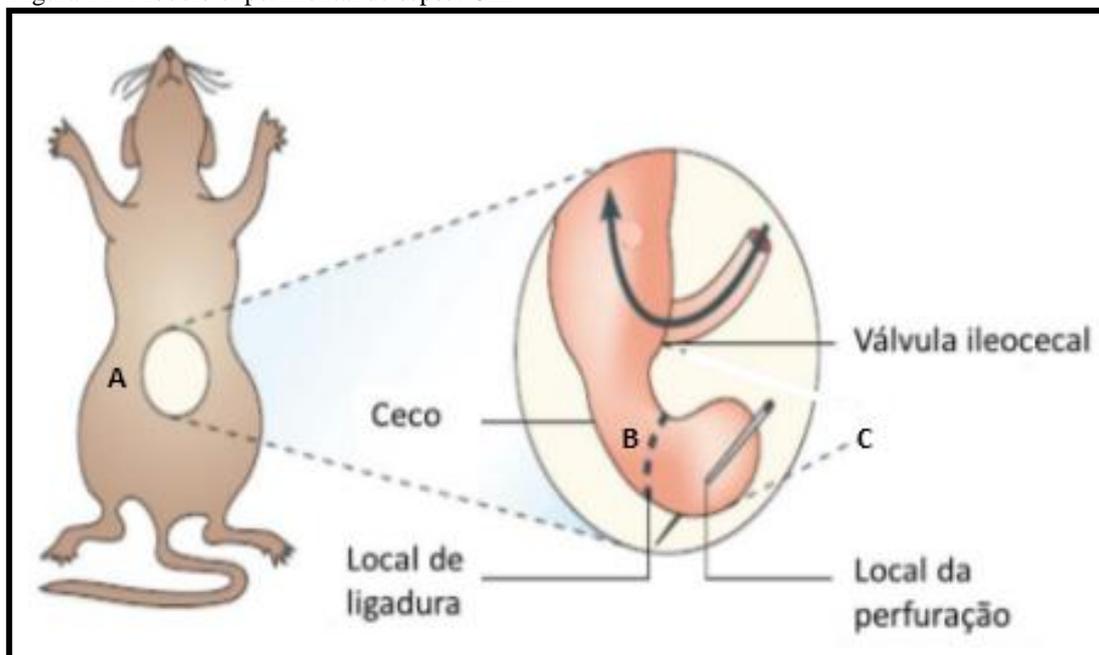
3.4.1 Indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal

Inicialmente, os animais foram analgesiados via subcutânea com tramadol (12,5 mg/kg) e, após um intervalo de 5 minutos, anestesiados intraperitonealmente com quetamina (80 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg) (administradas conjuntamente). Após a sedação total do animal, foi realizada a tricotomização e assepsia da região inferior do abdômen com álcool 70% e clorexidina 0,2%. A fim de minimizar a contaminação, os materiais cirúrgicos foram esterilizados no intervalo entre cada animal com álcool 70% e por um esterilizador de alicates durante um período mínimo de 15 minutos (OLIVERE *et al.*, 2018).

O acesso ao intestino adjacente e ao ceco foi realizado através de uma laparotomia mediana de aproximadamente 1,5 cm. Em seguida, o ceco foi exposto e ligado com uma sutura de seda (3,0 cm) na sua base (abaixo da válvula ileocecal), onde foi perfurado duas vezes com uma agulha calibre 18G. O ceco exposto foi pressionado delicadamente para extrudar uma pequena quantidade de fezes através da perfuração. Posteriormente, o mesmo foi devolvido à cavidade abdominal, e a laparotomia foi fechada em quatro pontos com sutura de fio de seda (4,0 cm). Os animais do grupo controle (Sham) tiveram o ceco

exteriorizado e retornado ao abdômen e a cavidade abdominal suturada conforme mencionado (Figura 11) (OLIVERE *et al.*, 2018).

Figura 11- Modelo experimental de sepse: CLP



Fonte: Adaptado de BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005.

Nota: A figura 11 demonstra o procedimento da técnica de ligadura e perfuração cecal. O ceco é exposto por laparotomia e em seguida o mesentério é cortado (A). Para que haja uma quantidade considerável de conteúdo cecal a ser extrudado, o mesmo é empurrado em direção a porção final do ceco. Uma haste flexível é posicionada abaixo do ceco, a fim de auxiliar na sua ligadura parcial (B). A região inferior do ceco é perfurada duas vezes (C), em porções menos vascularizadas, para evitar hemorragia. O ceco é então espremido delicadamente para extrudar o conteúdo cecal e devolvido à cavidade abdominal. Para finalizar, a musculatura e a pele são suturadas. É recomendado deixar uma porção adicional de linha de sutura para que o animal possa roer, impedindo o rompimento dos pontos antes da cicatrização completa.

Imediatamente após o término da cirurgia, todos os animais receberam, em dose única, solução fisiológica (NaCl) 0,9% (50 ml/kg, i.p) e pentabiótico (0,01 ml/100g, v.m). Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram novamente analgesiados com tramadol (12,5 mg/kg, v.s). Os animais foram alocados individualmente em caixas de acrílico de formato retangular (30 cm x 19,5 cm x 12 cm), onde permaneceram por no mínimo 10 dias, permitindo a sua recuperação total. Para minimizar a variabilidade entre diferentes experimentos, o procedimento cirúrgico foi realizado pelo mesmo pesquisador (CANNON *et al.*, 2010; OLIVERE *et al.*, 2018; RITTIRSCH *et al.*, 2009; TURNBULL *et al.*, 2003).

3.4.2 Tratamento com curcumina

A curcumina apresentada na forma de pó foi suspensa em carboximetilcelulose 0,5% e aplicada na dose de 50 mg/kg (SORRENTI, *et al.*, 2018; REIS, 2018). Após a suspensão do composto, foi administrado aos animais Sham e CLP: veículo (1 ml/kg) ou curcumina (50 mg/kg) por gavagem, por um período de 7 dias consecutivos, às 07h30.

3.4.3 Coleta e processamento do tecido cerebral

Os animais foram analgesiados subcutâneamente com tramadol (12 mg/kg) e, após um intervalo de 5 minutos, os mesmos foram decapitados, e os encéfalos coletados. Os hipocampus foram dissecados sobre o gelo, em uma temperatura de 4 °C. Imediatamente após a dissecação, as estruturas foram congeladas individualmente em nitrogênio líquido e armazenadas em um freezer a -80 °C, até o momento da utilização.

3.4.4 Avaliação de nitrosilação proteica total

A técnica de captura de S-nitrosotióis, baseia-se na captura de resíduos S-nitrosilados (RS-NO) através da resina tiopropil cefarose. O homogenato (amostra) que possui ou não proteínas S-nitrosiladas, sofreu o processo de desnaturação e bloqueio dos tíois livres por SDS e metilmetanotiosulfonato (MMTS) durante 2h, seguido de três ciclos de remoção do MMTS excedente por precipitação com acetona 70%.

Posteriormente, o homogenato (amostra) foi incubado com a resina e ácido ascórbico (AA) e tiopropil cefarose por 12h a temperatura ambiente. Ao término, a amostra foi centrifugada à 1000g por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* foi lavado com 1ml de tampão HENS por 4x e posteriormente com HEN/10 SDS por mais 5x.

Após a última lavagem, o sobrenadante foi retirado e adicionado junto a ele o tampão de eluição (HEN/10 SDS + 2% de beta-mercaptoetanol), o qual ficou sobre agitação por um período de 1h a temperatura ambiente. Em seguida, o homogenato foi novamente centrifugado e o sobrenadante transferido para um *eppendorf* contendo tampão Laemmli. Dessa forma, obtemos dois *eppendorfs* para cada amostra. Um contendo proteína total antes da captura com resina (*input*) e um contendo apenas proteínas nitrosiladas (*output*). O *output*

foi posteriormente utilizado para avaliar as porcentagens de proteínas nitrosiladas comparado com o total de proteínas (*input*).

3.4.5 Ensáio do Ácido Tiobarbitúrico

O ensaio das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), permite avaliar a reação do TBARS com o malondialdeído e outros produtos secundários da peroxidação lipídica. Foi elaborada uma curva padrão (controle) para diluição em série a partir de um *buffer* contendo: ácido acético glacial, dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6%, malondialdeído (MDA) 0,03mM e água. Em seguida, as amostras hipocampais foram homogeneizadas em tampão HCL 10mM pH 7,4 e deixadas em banho maria à 97°C por 1h. Posteriormente, todas as amostras (curva padrão e hipocampais) foram centrifugadas por 10 minutos em 3500 rpm e lidas com o comprimento de onda em 532 nm.

3.4.6 Fluorescência Relativa de Lucigenina

A técnica de fluorescência relativa de lucigenina, é utilizada para detectar a produção de superóxido através de fontes enzimáticas. Após remover as amostras do freezer -80°C, transferimos individualmente as amostras para uma placa de petri e cortamos uma pequena fração com o auxílio de um bisturi. Em seguida, armazenamos imediatamente o restante da amostra no gelo seco e a fração retirada foi transferida para um homogeneizador de vidro contendo 150µL de tampão fosfato pH 7,4.

Após total homogeneização, o homogenato (amostra) foi transferido para um eppendorf e agitado com auxílio de um vórtex por aproximadamente 5 segundos. Em seguida, transferimos 50µL do mesmo para os poços de uma placa branca de 96 poços DYNEX. A lucigenina foi preparada em um tubo Falcon de 15ml envolto em papel alumínio contendo 175 µL de tampão fosfato pH 7,4 e 1,25µL de lucigenina na concentração de 10^{-3} M para cada amostra. A seguir, colocamos o tampão fosfato mais a lucigenina no poço (já contendo a amostra), a placa foi imediatamente coberta com papel alumínio e levada ao equipamento para leitura Synergy H1 Hybrid Reader. Após a leitura basal (somente lucigenina + amostra), pipetamos 25 de NADPH em cada poço e colocamos a placa

novamente no equipamento para posterior leitura. Os resultados foram expressos como RLU/ μ g de proteína.

3.4.7 Capacidade antioxidante total de retenção de radicais

O uso do trap foi recentemente proposto para explorar a propriedade antioxidante de uma amostra. Sendo assim, esse ensaio permite medir o estresse oxidativo nos animais. O trap foi realizado conforme o método descrito por Eva Feldman, 2019.

Em uma placa de fundo branco, foi construída uma curva padrão (controle) a partir de um *buffer* para diluição em série contendo PB 100mM pH 8,6, ABAP 200 mM e luminol 5mM. A amostra hipocampal foi colocada nos demais poços junto ao PB 100mM pH 8,6, ABAP 200 mM e luminol 5Mm e em seguida lida a cada 30 segundos durante 20 minutos.

3.4.8 GSH e GSSH

Para determinar a atividade da GSH e GSSH, foi realizada uma curva padrão (controle) a partir de um *buffer* contendo: água (branco), GSH, padrão, TFK 1M e DTNB 10mM. O hipocampo foi diluído com TCA 10% na proporção de 1:1. Em seguida o homogenato foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante (amostra) retirado. A amostra foi adicionada ao padrão e aos reagentes TFK 1M e DTNB 10mM e lida imediatamente com o comprimento de onda em 412 nm.

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

A seguir, serão descritos os testes comportamentais que foram realizados neste estudo.

3.5.1 Campo Aberto

A avaliação deste teste nos permite verificar a atividade locomotora em roedores. Os animais foram colocados individualmente no centro de uma arena quadrada de acrílico, de fundo preto, com 60 cm de largura e paredes com 20 cm de altura e filmados por um período de 20 minutos para posterior análise. Entre cada teste, o aparato foi limpo com solução de etanol a 5%, e a análise foi realizada automaticamente pelo software Ethovision® XT versão

9.0 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, EUA) (WILCONSON *et al.*, 2007; TOYAMA, 2012).

Figura 12 – Aparato referente ao teste de Campo Aberto



Fonte: Autora.

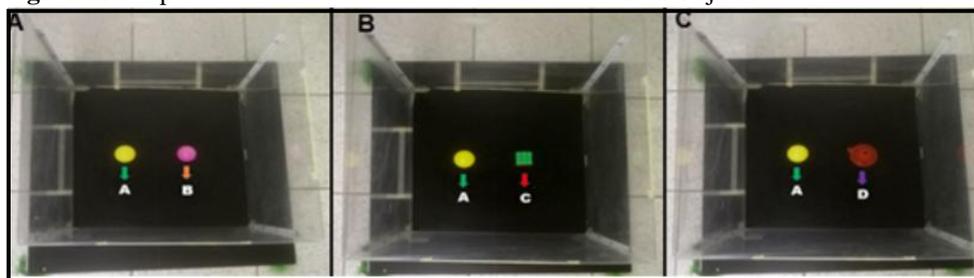
Nota: A figura 12 representa o aparato de acrílico quadrado utilizado no teste de Campo Aberto.

3.5.2 Reconhecimento de Objetos

O teste de reconhecimento de objetos permite-nos avaliar a memória de reconhecimento de curto e longo prazo em roedores. Os animais foram habituados individualmente a uma arena quadrada de acrílico de fundo preto (60 cm de largura e 20 cm de altura) previamente limpa com solução de etanol a 5%, por dois dias consecutivos durante 20 e 10 minutos, respectivamente. No dia do teste, foram apresentados aos animais dois objetos de formas idênticas (A e B), e a exploração aos mesmos foi aguardada por 10 minutos.

A memória de reconhecimento de curta duração foi verificada após 2 horas, quando apresentamos ao animal um dos objetos do treino (A ou B) e um novo objeto de forma diferente (C). Já a memória de reconhecimento de longa duração foi verificada 24 horas após o teste de memória de curta duração, quando apresentamos ao animal um dos objetos do treino (A ou B) e outro novo objeto de forma diferente (D) (HABA *et al.*, 2012; SIOPI *et al.*, 2012).

Figura 13 – Aparato referente ao teste de Reconhecimento de Objetos



Fonte: Autora.

Nota: A figura 13 representa o aparato de acrílico quadrado utilizado no teste de reconhecimento de objetos. Em A, temos os objetos A e B, ambos em formato de esfera, utilizados antes da avaliação das memórias de curta e longa duração. Em B, é representado o aparato adaptado para a avaliação da memória de curta duração, onde temos os objetos familiar (A), em formato de esfera, e novo (C), em formato de cubo. Em C, é representado o aparato adaptado para a avaliação da memória de longa duração, onde temos os objetos familiar (A), em formato de esfera, e novo (D), em formato de pirâmide.

A avaliação das memórias de reconhecimento de curta e longa duração foram realizadas por meio da filmagem dos animais durante 10 minutos, cujos os parâmetros de avaliação considerados foram o tempo de exploração de cada um dos objetos e o índice de reconhecimento (IR). O IR foi calculado conforme as equações a seguir:

$$IR = \frac{TEC - TEA}{TEC + TEA} \text{ para memória de curta duração}$$

$$IR = \frac{TED - TEA}{TED + TEA} \text{ para memória de longa duração}$$

Onde:

TEA: tempo de exploração do objeto A

TEC: tempo de exploração do objeto C

TED: tempo de exploração do objeto D

O IR também foi calculado pelas equações abaixo, cujo os dados estão apresentados nos Anexos 1 e 2.

$$IR = \frac{TEA}{TEA + TEC} \text{ para memória de curta duração}$$

$$IR = \frac{TED}{TEA + TED} \text{ para memória de longa duração}$$

Onde:

TEA: tempo de exploração do objeto A

TEC: tempo de exploração do objeto C

TED: tempo de exploração do objeto D

3.5.3 Labirinto Aquático de Morris

O teste do labirinto aquático de Morris permite-nos avaliar a aquisição de memória e cognição espacial. Foi utilizado um tanque circular azul (90 cm de diâmetro e 50 cm de altura) e uma plataforma de acrílico transparente (35 cm de altura), com uma base superior circular (13 cm de diâmetro). O tanque foi preenchido com água até que a plataforma se encontrasse submersa 2 centímetros abaixo da linha d'água. Para a completa invisibilização da mesma, foram utilizados 2 gramas de corante alimentício azul e 200 gramas de amido de milho, de maneira que a água adquirisse a mesma coloração do tanque. Inicialmente, o animal passou por uma etapa de treinamento durante 5 dias consecutivos. O treinamento consistiu em quatro ensaios diários, com tempo máximo de 120 segundos cada e intervalo de 60 segundos entre um ensaio e outro. Quando o tempo máximo do ensaio foi atingido sem que o animal encontre a plataforma, o mesmo foi guiado até ela. O tempo de permanência do animal na plataforma foi estipulado em 15 segundos. Nessa etapa, em cada ensaio foi registrado o tempo (segundos) de latência despendido pelos animais para alcançar a plataforma.

O dia do teste foi conduzido 24 horas após o último treino e consistiu em um único ensaio com duração de 120 segundos sem a presença da plataforma no tanque. As análises dos parâmetros latência para alcançar o quadrante alvo (local onde se encontrava a

plataforma), tempo de permanência no quadrante alvo, distância percorrida e velocidade foram realizadas automaticamente pelo software Ethovision® XT versão 9.0 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, EUA) (Figura 16) (BATINIC *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2018).

Figura 14 - Aparato referente ao teste Labirinto aquático de Morris



Fonte: Autora.

Nota: A figura 14 representa o aparato utilizado no teste de labirinto aquático de Morris. Em A, é representado o tanque em formato circular, preenchido com água, contendo a plataforma de acrílico submersa (C). Em B, é representado o tanque preenchido com água contendo corante alimentício da cor azul e amido de milho, necessários para tornar a água turva e, consequentemente, para dificultar a visualização da plataforma. Em C, é representada a plataforma de acrílico utilizada durante os treinos.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados utilizando o programa do software GraphPad versão 8.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Na primeira etapa do presente estudo, a comparação entre os grupos Sham e CLP, quanto aos parâmetros analisados nos testes comportamentais de reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris, foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste *t*-Student. A ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de *Tukey* foi utilizada para comparar os dados entre os grupos Sham e CLP quanto aos parâmetros comportamentais do teste de campo aberto e tempo de latência para chegar à plataforma durante os treinos, no teste de labirinto aquático de Morris.

Na segunda etapa deste trabalho, a ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de *Tukey* foi utilizada para comparar o efeito dos tratamentos (veículo ou curcumina, v.o) sobre todos parâmetros analisados nos testes comportamentais já mencionados, além do nível

hipocampal de nitrosilação proteica, TBARS, trap, GSH e GSSG e de fluorescência relativa de lucigenina em animais submetidos à simulação ou indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal. O nível de significância em ambas as etapas foi baseado em valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$).

Além disso, comparações estatísticas foram conduzidas usando ANOVA unilateral ou bidirecional quando $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente negativo. Dessa forma, determinamos o tamanho do efeito (ES) a partir do teste de ANOVA de uma via, por meio do valor de d -Cohen (d), e para ANOVA de duas vias, por meio do valor ômega quadrado (ω^2). A interpretação do ES para o teste de d -Cohen foi: $\leq 0,19$ ausente, $\geq 0,20$ pequeno, $\geq 0,50$ médio, $\geq 0,80$ grande e $\geq 1,20$ muito grande. Já para ω^2 , a interpretação para o ES foi: $\leq 0,01$ ausente, $\geq 0,02$ pequeno efeito, $\geq 0,06$ efeito moderado, $\geq 0,14$ grande efeito e $\geq 1,15$ muito grande.

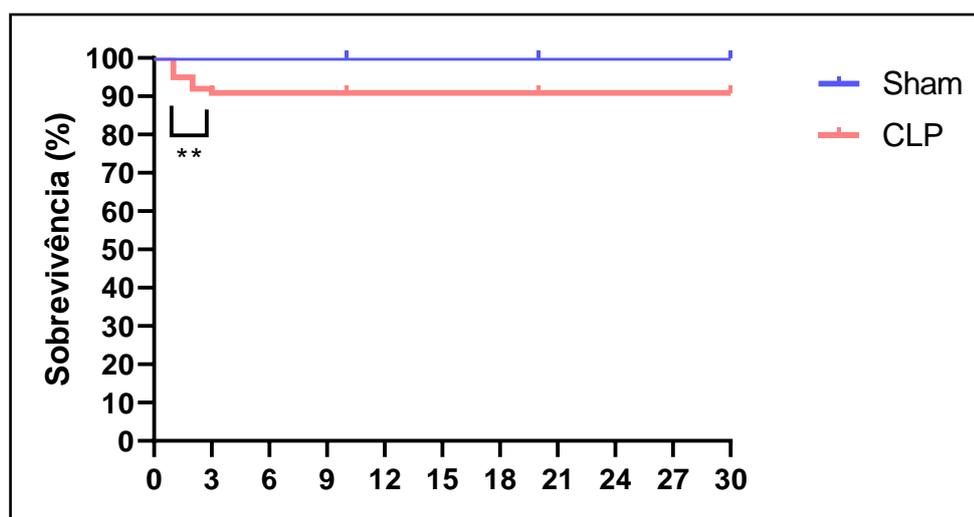
4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA EM ANIMAIS SHAM E CLP

4.1.1 Taxa de sobrevivência

A seguir, a Figura 15 mostra a taxa de sobrevivência em animais Sham e CLP utilizados no presente estudo. Notamos que apenas nos três primeiros dias houve um aumento da taxa de mortalidade em animais CLP ($p > 0,001$) quando comparado ao grupo Sham (análises estatísticas – Tabela 3).

Figura 15 – Taxa de sobrevivência em animais Sham e CLP



Fonte: Autora.

Nota: A figura 15 mostra a taxa de sobrevivência em animais Sham e CLP. Estatística: teste de *t*-Student ($n = 10$) ** $p < 0,01$ comparado ao grupo Sham. Os tamanhos do efeito foram interpretados como: ausente $d \leq 0,19$, pequeno $d \geq 0,20$, moderado $d \geq 0,50$, grande $d \geq 0,80$ e muito grande $d \geq 1,20$.

Tabela 3 - Análise do tamanho do efeito por meio do *d* Cohen na taxa de sobrevivência em animais Sham e CLP

Parâmetros	<i>d</i> Cohen	
	Sham	CLP
Sobrevivência	$d = 1,07$	$d = 1,07$

Fonte: Autora.

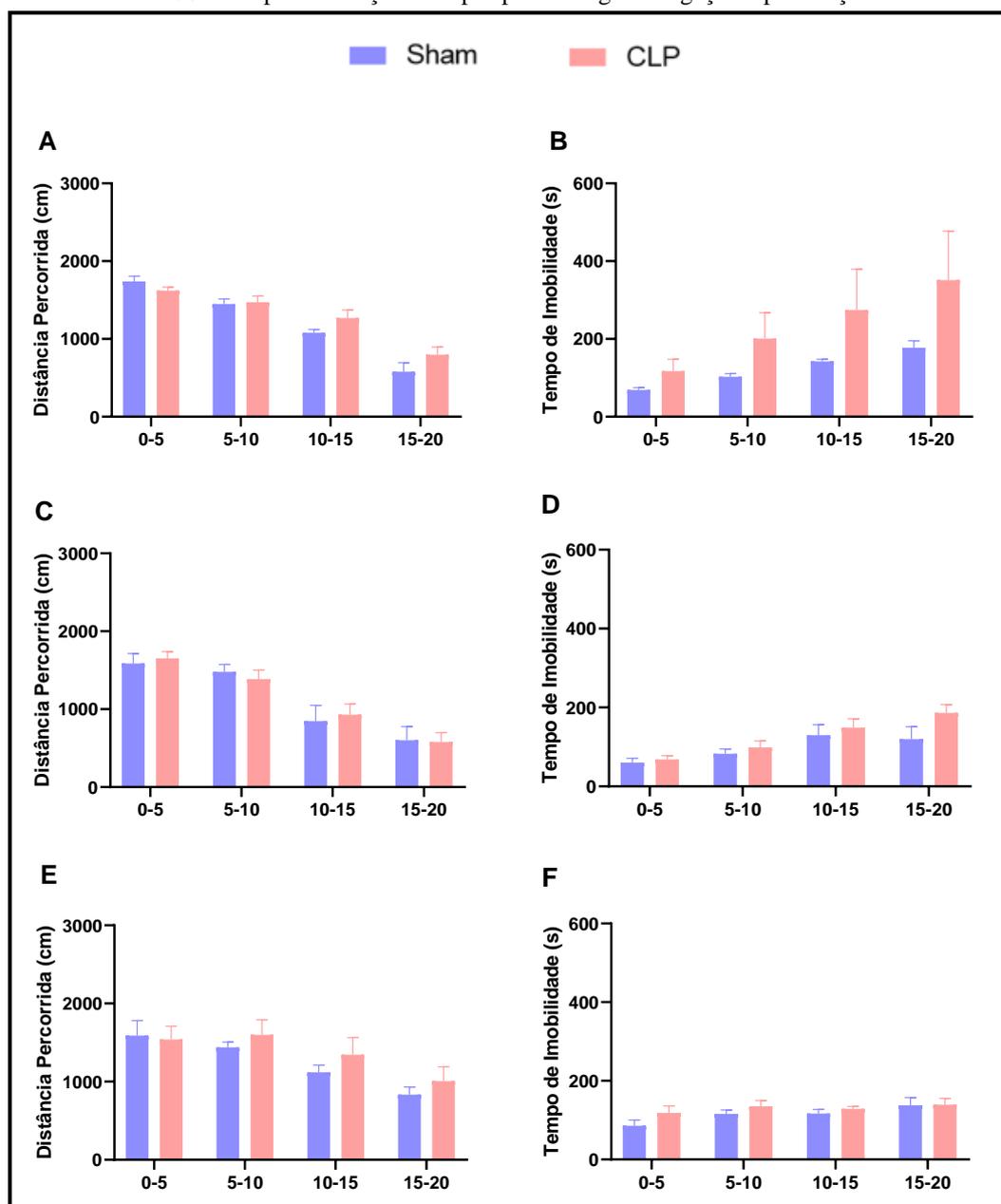
4.2 AVALIAÇÃO TEMPORAL DO COMPORTAMENTO COGNITIVO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE

4.2.1 Campo Aberto

A seguir, a Figura 16 mostra o desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de campo aberto 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal. Não notamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos Sham e CLP quanto aos parâmetros distância percorrida (Fig. 16A, 16C e 16E, respectivamente) e tempo de imobilidade (Fig. 16B, 16D e 16F, respectivamente) em nenhum dos dias testados.

Todavia, ao observamos os dados relacionados ao tempo de duração do teste de campo aberto (20 minutos), notamos em animais Sham e CLP, em todos os dias testados, uma significativa redução da distância percorrida e um elevado tempo de imobilidade no final do teste (15-20 minutos), quando comparado ao tempo inicial do mesmo (0-5 minutos) ($p > 0,0001$ para ambos os parâmetros, Fig. 16) (análises estatísticas – Tabela 4). Esse achado sugere uma maior motivação inicial em explorar o ambiente novo, a qual reduz à medida que o animal conhece o ambiente (SOL; GRIFO; BARTOMEUS, 2012).

Figura 16 – Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de campo aberto 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal



Fonte: Autora.

Nota: Em A e B, temos respectivamente os parâmetros distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s) em animais sobreviventes à sepse induzida há 10 dias. Em C e D, temos respectivamente os parâmetros distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s) em animais sobreviventes à sepse induzida há 20 dias. Em E e F, temos respectivamente os parâmetros distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s) em animais sobreviventes à sepse induzida há 30 dias. Estatística: ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey ($n = 10$): **** $p < 0,0001$. Os tamanhos do efeito foram interpretados como: ausente $\omega^2 \leq 0,01$, pequeno $\omega^2 \geq 0,02$, moderado $\omega^2 \geq 0,06$, grande $\omega^2 \geq 0,14$ e muito grande $\omega^2 \geq 1,15$.

Tabela 4 - Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado no teste de campo aberto, em grupos Sham e CLP (cirurgia), durante 20 minutos (tempo), 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.

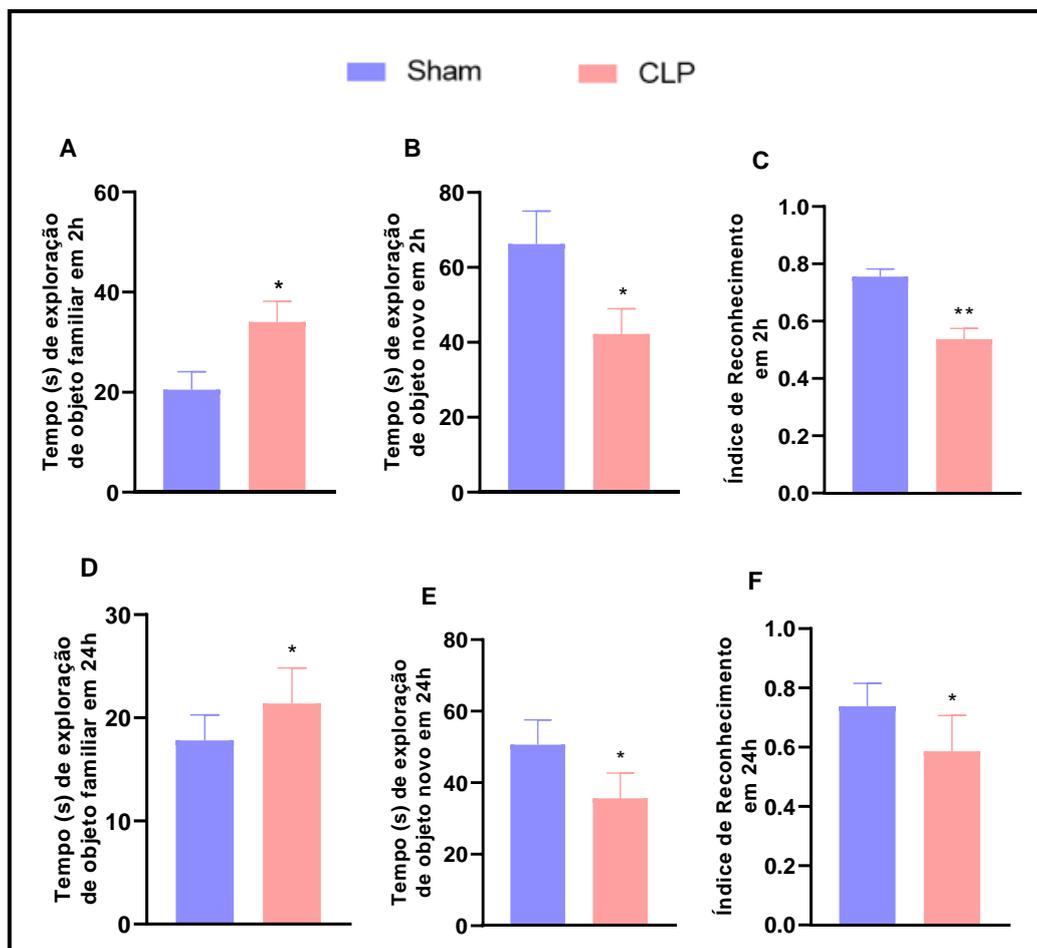
Parâmetros	Cirurgia	Tempo	Interação
Distância percorrida 10 dias	F (3, 72) = 56,03 P < 0,0001 $\omega^2 = 0,86$	F (1, 72) = 1,870 P = 0,1758 $\omega^2 = 164,89$	F (3, 72) = 1,839 P = 0,1478 $\omega^2 = 2,51$
Tempo de Imobilidade 10 dias	F (1, 72) = 6,202 P = 0,0151 $\omega^2 = 5,19$	F (3, 72) = 2,636 P = 0,0561 $\omega^2 = 4,89$	F (3, 72) = 0,3413 P = 0,7956 $\omega^2 = -1,97$
Distância p percorrida 20 dias	F (1, 60) = 0,005120 P = 0,9432 $\omega^2 = -0,99$	F (3, 60) = 24,83 P < 0,0001 $\omega^2 = 71,46$	F (3, 60) = 0,1830 P = 0,9075 $\omega^2 = -2,44$
Tempo de Imobilidade 20 dias	F (1, 72) = 3,678 P = 0,0591 $\omega^2 = 2,62$	F (3, 72) = 8,396 P < 0,0001 $\omega^2 = 21,76$	F (3, 72) = 0,8402 P = 0,4763 $\omega^2 = -0,47$
Distância percorrida 30 dias	F (1, 72) = 1,252 P = 0,2668 $\omega^2 = 0,25$	F (3, 72) = 6,869 P = 0,0004 $\omega^2 = 17,60$	F (3, 72) = 0,2826 P = 0,8378 $\omega^2 = -2,15$
Tempo de Imobilidade 30 dias	F (1, 72) = 2,612 P = 0,1104 $\omega^2 = 3,61$	F (3, 72) = 2,253 P = 0,0895 $\omega^2 = 1,55$	F (3, 72) = 0,4086 P = 0,7473 $\omega^2 = -1,70$

Fonte: Autora.

4.2.2 Reconhecimento de Objetos

As Figuras 17, 18 e 19 mostram, respectivamente, o desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse. Notamos, em animais sobreviventes à sepse induzida há 10 dias, um aumento no tempo de exploração ao objeto familiar ($p < 0,01$, Fig. 17A) e uma significativa redução do tempo de exploração ao objeto novo ($p < 0,01$, Fig. 17B) e do índice de reconhecimento ($p < 0,001$, Fig. 17C) em 2 horas, quando comparados ao grupo controle. Já em 24 horas, notamos um aumento do tempo de exploração ao objeto familiar ($p < 0,01$, Fig. 17D), uma diminuição do tempo de exploração ao objeto novo ($p < 0,01$, Fig. 17E) e um menor índice de reconhecimento ($p < 0,01$, Fig. 17F) em animais CLP, quando comparado ao grupo Sham (análises estatísticas – Tabela 5).

Figura 17 – Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos, 10 dias após a simulação ou indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.



Fonte: Autora.

Nota: Em A, B e C, temos, respectivamente, os parâmetros tempo de exploração ao objeto familiar (s), tempo de exploração ao objeto novo (s) e índice de reconhecimento em 2 horas. Em D, E e F, temos, respectivamente, os parâmetros tempo de exploração ao objeto familiar (s), tempo de exploração ao objeto novo (s) e índice de reconhecimento, em 24 horas, em animais sobreviventes à sepse induzida por ligação e perfuração cecal há 10 dias. Estatística: teste de *t*-Student ($n = 10$) * $p < 0,01$ e ** $p < 0,01$ comparados ao grupo Sham. Os tamanhos do efeito foram interpretados como: ausente $d \leq 0,19$, pequeno $d \geq 0,20$, moderado $d \geq 0,50$, grande $d \geq 0,80$ e muito grande $d \geq 1,20$

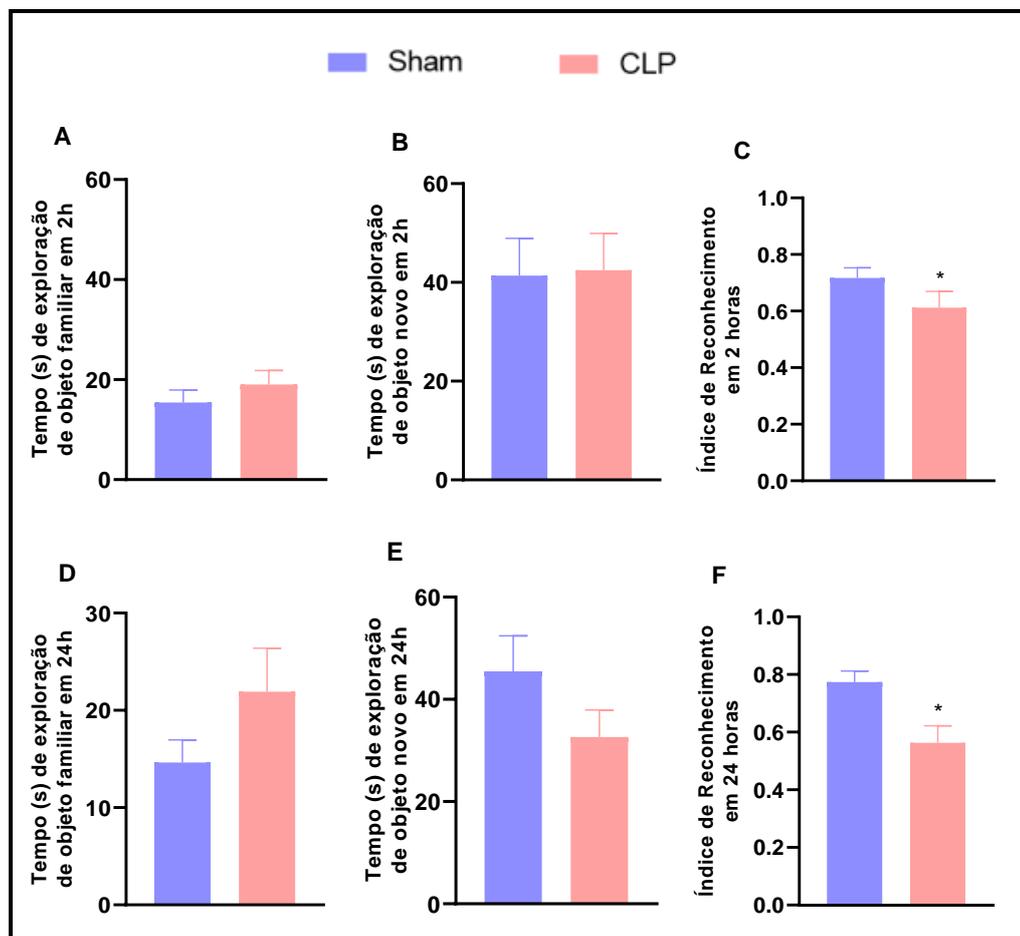
Tabela 5 - Análise do tamanho do efeito por meio do *d* Cohen no teste reconhecimento de objetos, entre os grupos Sham e CLP, 10 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.

Parâmetros	<i>d</i> Cohen	
	2h	24h
Tempo de exploração ao objeto familiar	<i>d</i> = 1,07	<i>d</i> = 1,07
Tempo de exploração ao objeto novo	<i>d</i> = 1,34	<i>d</i> = 1,34
Índice de reconhecimento	<i>d</i> = 1,27	<i>d</i> = 1,28

Fonte: Autora.

Quanto aos animais sobreviventes à sepse induzida há 20 dias, notamos em 2 horas uma discreta diminuição do parâmetro índice de reconhecimento ($p < 0,01$, Fig 18C), comparados ao grupo controle. Entretanto, em 24 horas pôde-se observar um aumento do tempo de exploração ao objeto familiar (Fig. 18D) e uma redução dos parâmetros tempo de exploração ao objeto novo (Fig. 18E) e índice de reconhecimento ($p < 0,01$, Fig. 18F), quando comparado ao grupo Sham (análises estatísticas – Tabela 6).

Figura 18 – Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos, 20 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal



Fonte: Autora.

Nota: Em A, B e C, temos respectivamente os parâmetros tempo de exploração ao objeto familiar (s), tempo de exploração ao objeto novo (s) e índice de reconhecimento em 2 horas. Em D, E e F, temos respectivamente os parâmetros tempo de exploração ao objeto familiar (s), tempo de exploração ao objeto novo (s) e índice de reconhecimento em 24 horas em animais sobreviventes à sepse induzida por ligação e perfuração cecal há 20 dias. Estatística: teste de *t*-Student ($n = 10$) * $p < 0,01$ comparado ao grupo Sham. Os tamanhos do efeito foram interpretados como: ausente $d \leq 0,19$, pequeno $d \geq 0,20$, moderado $d \geq 0,50$, grande $d \geq 0,80$ e muito grande $d \geq 1,20$.

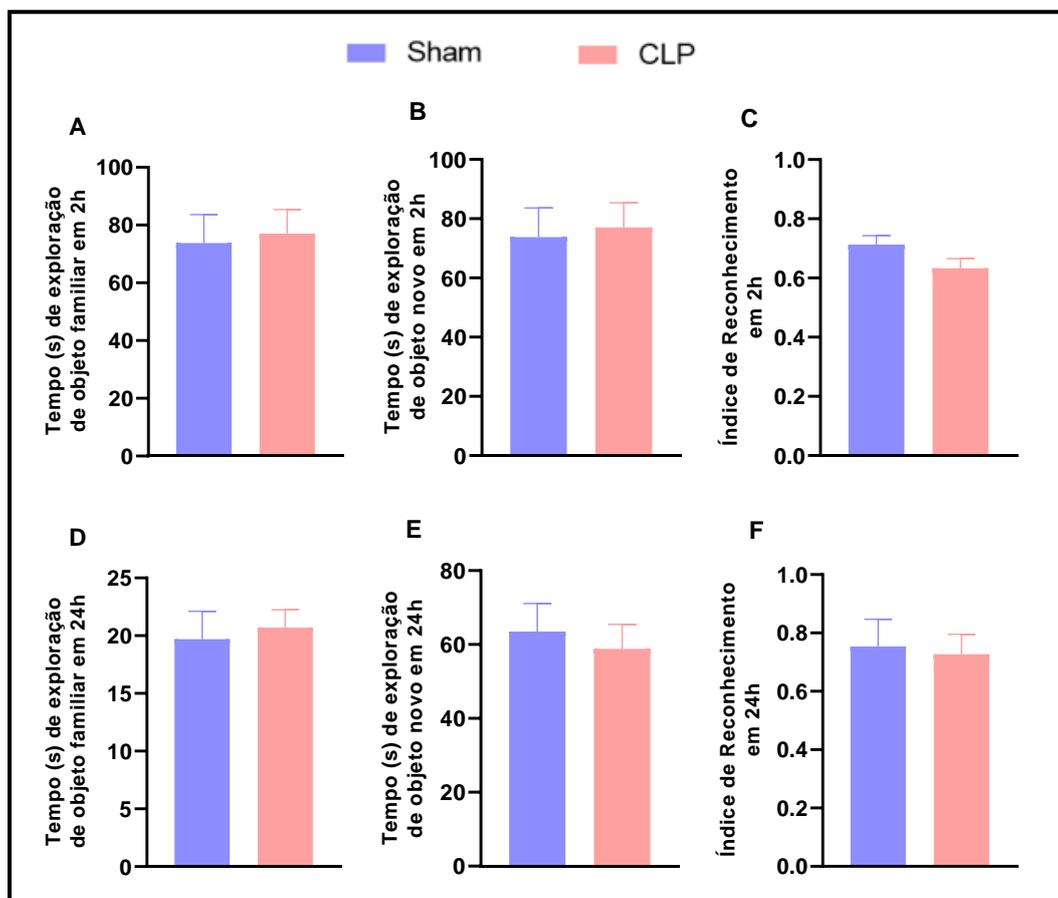
Tabela 6 - Análise do tamanho do efeito por meio do teste *d* Cohen no teste reconhecimento de objetos, em grupos Sham e CLP, 20 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.

Parâmetros	<i>d</i> Cohen	
	2h	24h
Tempo de exploração ao objeto familiar	$d = 0,48$	$d = 0,64$
Tempo de exploração ao objeto novo	$d = 0,21$	$d = 0,59$
Índice de reconhecimento	$d = 1,12$	$d = 1,33$

Fonte: Autora.

Já as análises das memórias de curta duração (2h) e longa duração (24h) em animais submetidos à cirurgia de ligação e perfuração cecal há 30 dias (Fig. 19) não indicaram diferença estatística significativa entre os grupos testados (análise *d* Cohen – Tabela 7).

Figura 19 – Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos, 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal



Fonte: Autora.

Nota: Em A, B e C, temos respectivamente os parâmetros tempo de exploração ao objeto familiar (s), tempo de exploração ao objeto novo (s) e índice de reconhecimento em 2 horas. Em D, E e F, temos respectivamente os parâmetros tempo de exploração ao objeto familiar (s), tempo de exploração ao objeto novo (s) e índice de reconhecimento em 24 horas em animais sobreviventes à sepse induzida por ligação e perfuração cecal há 30 dias. Estatística: teste de *t*-Student ($n = 10$). Os tamanhos do efeito foram interpretados como: ausente $d \leq 0,19$, pequeno $d \geq 0,20$, moderado $d \geq 0,50$, grande $d \geq 0,80$ e muito grande $d \geq 1,20$.

Tabela 7 - Análise do tamanho do efeito por meio do teste *d* Cohen no teste reconhecimento de objetos, em grupos Sham e CLP, 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal.

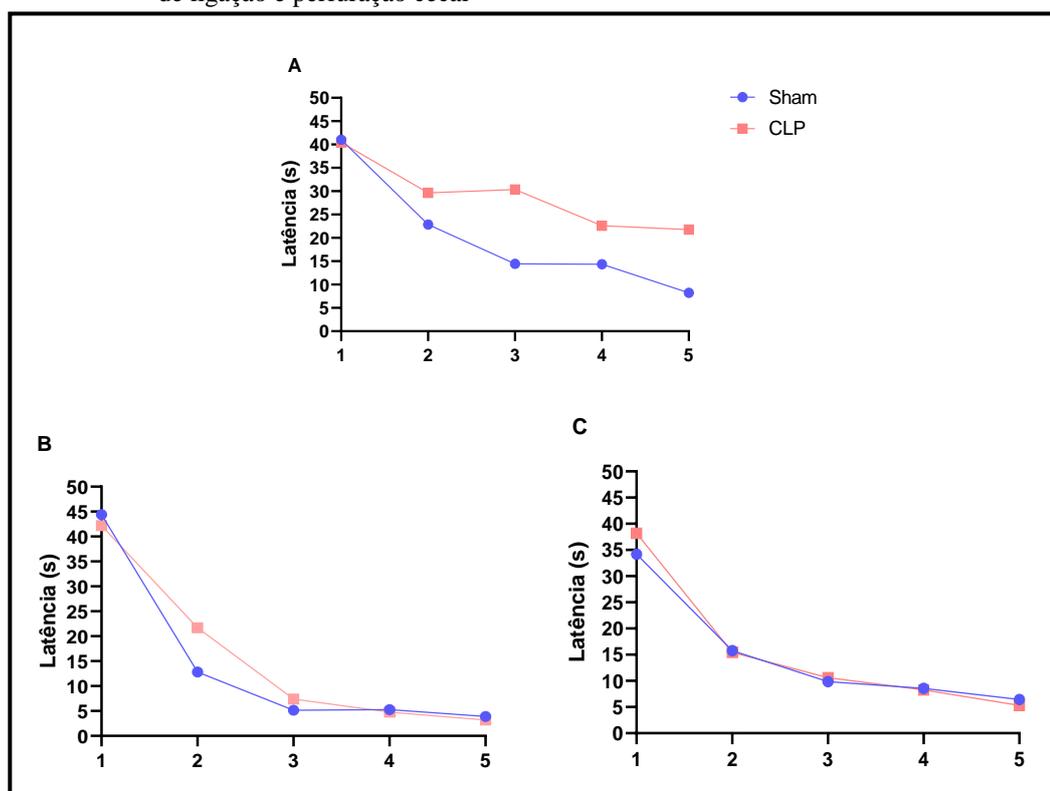
Parâmetros	<i>d</i> Cohen	
	2h	24h
Tempo de exploração ao objeto familiar	$d = 0,67$	$d = 0,15$
Tempo de exploração ao objeto novo	$d = 0,07$	$d = 0,29$
Índice de reconhecimento	$d = 0,84$	$d = 0,40$

Fonte: Autora.

4.2.3 Labirinto Aquático de Morris

A Figura 20 apresenta a performance comportamental durante a etapa de treinos do teste labirinto aquático de Morris em ratos machos adultos após a indução da sepse há 10, 20 ou 30 dias. É possível observar que os animais CLP sobreviventes à sepse induzida há 10 dias apresentaram um aumento significativo da latência para encontrar a plataforma (Fig. 20A) durante os 5 dias de treino, quando comparados ao grupo controle. Quanto à análise da performance de animais CLP sobreviventes à sepse há 20 dias, observamos um aumento do tempo de latência apenas no segundo dia de treino em relação aos animais Sham (Fig. 20B). Já em animais sobreviventes à sepse induzida há 30 dias, não notamos diferença estatística significativa entre os grupos testados (Fig. 20C) (análises estatísticas – Tabela 8).

Figura 20 – Performance comportamental em animais submetidos à etapa de treino do teste de labirinto aquático de Morris 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal



Fonte: Autora.

Nota: Em A, B e C temos o parâmetro latência para atingir a plataforma (s) em animais submetidos à simulação ou indução da sepse por ligação e perfuração cecal há 10, 20 ou 30 dias, respectivamente. Estatística: teste de *t*-Student ($n = 10$). Os tamanhos do efeito foram interpretados como: ausente $\omega^2 \leq 0,01$, pequeno $\omega^2 \geq 0,02$, moderado $\omega^2 \geq 0,06$, grande $\omega^2 \geq 0,14$ e muito grande $\omega^2 \geq 1,15$.

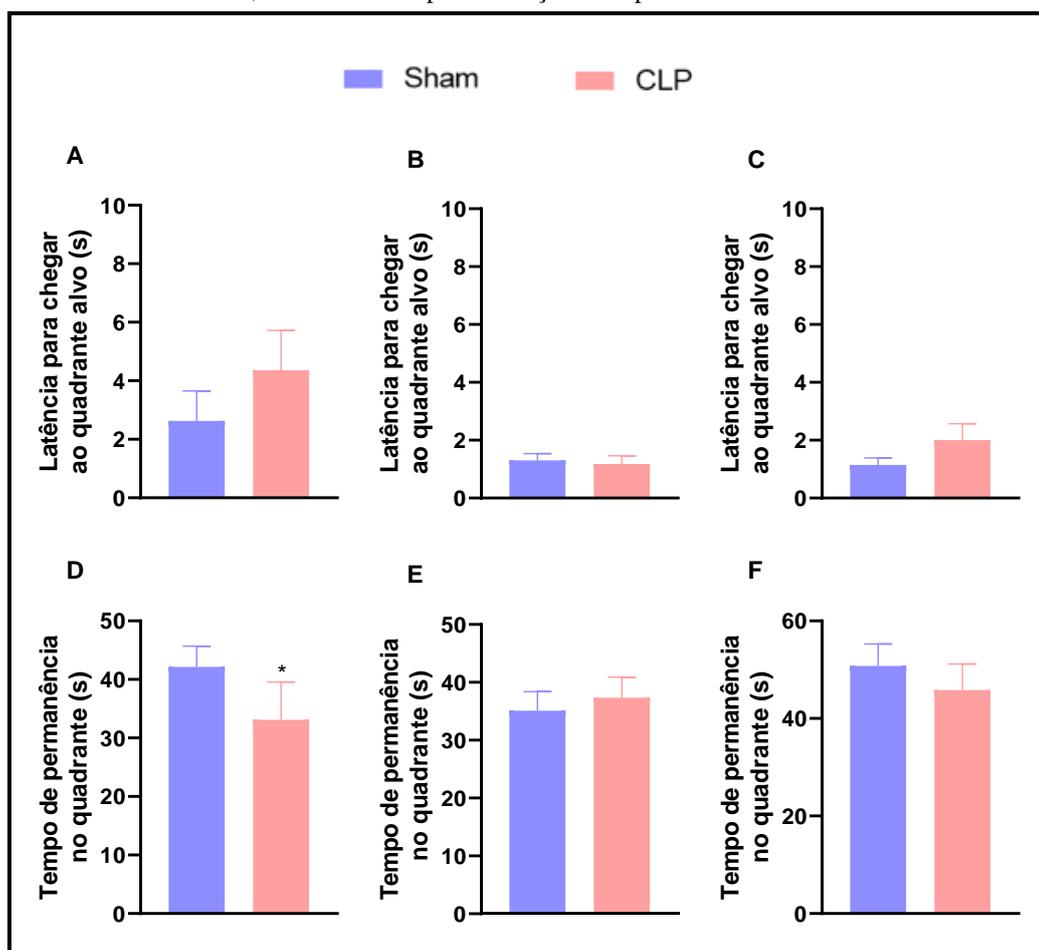
Tabela 8 - Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado no teste de labirinto aquático de Morris, em grupos Sham e CLP (cirurgia), durante 5 dias (tempo), 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.

Parâmetros	Cirurgia	Tempo	Interação
Latência 10 dias	F (1, 90) = 3,644 P = 0,0595 $\omega^2 = 2,22$	F (4, 90) = 3,759 P = 0,0071 $\omega^2 = 9,29$	F (4, 90) = 0,3893 P = 0,8158 $\omega^2 = -2,05$
Latência 20 dias	F (1, 89) = 0,5115 P = 0,4763 $\omega^2 = -0,26$	F (4, 89) = 46,77 P < 0,0001 $\omega^2 = 98,35$	F (4, 89) = 46,77 P < 0,0001 $\omega^2 = 0,35$
Latência 30 dias	F (1, 88) = 0,05933 P = 0,8081 $\omega^2 = -0,55$	F (4, 88) = 21,03 P < 0,0001 $\omega^2 = 47,58$	F (4, 88) = 0,1448 P = 0,9649 $\omega^2 = -2,03$

Fonte: Autora.

A Figura 21 mostra os dados obtidos a partir da performance comportamental do dia do teste de labirinto aquático de Morris em animais sobreviventes à sepse induzida há 10, 20 e 30 dias. É possível notar, em animais CLP sobreviventes à sepse induzida há 10 dias, um aumento significativo da latência para chegar ao quadrante alvo (Fig. 21A), bem como um tempo reduzido de permanência nesse local ($p > 0,01$, Fig. 21D) quando comparado ao grupo Sham. Já em animais sobreviventes à sepse induzida há 20 e 30 dias, não foi evidenciada, nos parâmetros analisados, diferença estatisticamente significativa entre os grupos testados (Fig. 21B, 21C, 21E e 21F, respectivamente) (análises estatísticas – Tabela 9).

Figura 21 – Performance comportamental em animais submetidos ao teste de labirinto aquático de Morris 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse



Fonte: Autora.

Nota: Em A, B e C, temos o parâmetro latência para atingir o quadrante alvo (s) em animais sobreviventes à sepse induzida por CLP há 10, 20 e 30 dias, respectivamente. Em C, D e E, temos o parâmetro tempo de permanência no quadrante alvo (s) em animais sobreviventes à sepse induzida por CLP há 10, 20 e 30 dias, respectivamente. Estatística: teste de *t*-Student ($n = 10$). * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sham. Os tamanhos do efeito foram interpretados como: ausente $d \leq 0,19$, pequeno $d \geq 0,20$, moderado $d \geq 0,50$, grande $d \geq 0,80$ e muito grande $d \geq 1,20$.

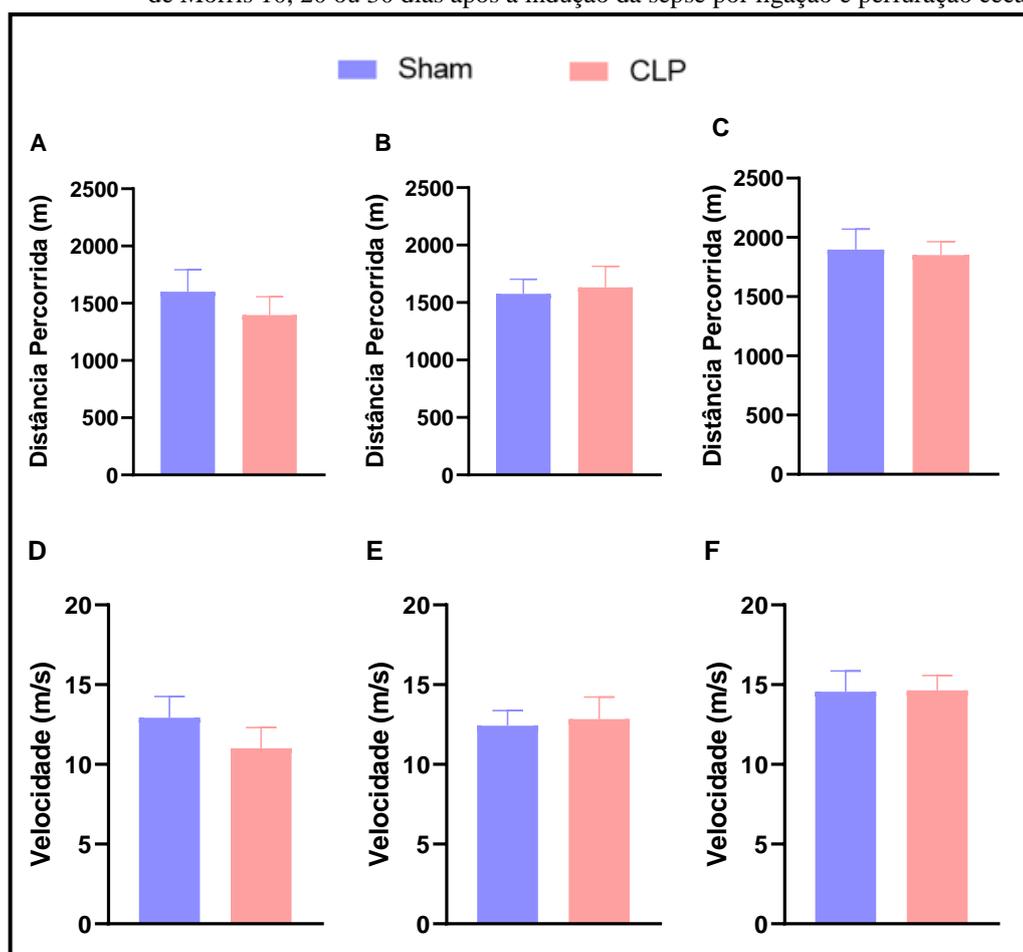
Tabela 9 - Análise do tamanho do efeito por meio do teste *d* Cohen no teste de labirinto aquático de Morris, entre os grupos Sham e CLP, 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal.

Parâmetros	<i>d</i> Cohen		
	10 dias	20 dias	30 dias
Latência para chegar ao quadrante alvo	$d = 0,83$	$d = 0,16$	$d = 0,21$
Tempo de permanência no quadrante alvo	$d = 1,13$	$d = 0,47$	$d = 0,23$

Fonte: Autora.

Os parâmetros distância percorrida e velocidade (Fig. 22) permitiram-nos validar os dados obtidos no teste de campo aberto, uma vez que não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos Sham e CLP em todos os dias testados. Diante disso, comprovamos mais uma vez que o animal sobrevivente à sepse induzida há 10, 20 ou 30 dias não apresenta prejuízo locomotor (análises estatísticas – Tabela 10).

Figura 22 – Performance comportamental em animais submetidos ao teste de labirinto aquático de Morris 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal



Fonte: Autora

Nota: Em A, B e C, temos o parâmetro distância percorrida (s) em animais submetidos à sepse induzida por ligação e perfuração cecal há 10, 20 ou 30 dias, respectivamente. Em D, E e F, temos o parâmetro velocidade (m/s) em animais submetidos à sepse induzida por ligação e perfuração cecal há 10, 20 ou 30 dias, respectivamente. Estatística: teste de *t*-Student ($n = 10$). Os tamanhos do efeito foram interpretados como: ausente $d \leq 0,19$, pequeno $d \geq 0,20$, moderado $d \geq 0,50$, grande $d \geq 0,80$ e muito grande $d \geq 1,20$.

Tabela 10 - Análise do tamanho do efeito por meio do teste *d* Cohen no teste de labirinto aquático de Morris, entre os grupos Sham e CLP, 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal.

Parâmetros	<i>d</i> Cohen		
	10 dias	20 dias	30 dias
Distância percorrida	$d = 0,03$	$d = 0,02$	$d = 0,01$
Velocidade	$d = 0,02$	$d = 0,04$	$d = 0,03$

Fonte: Autora

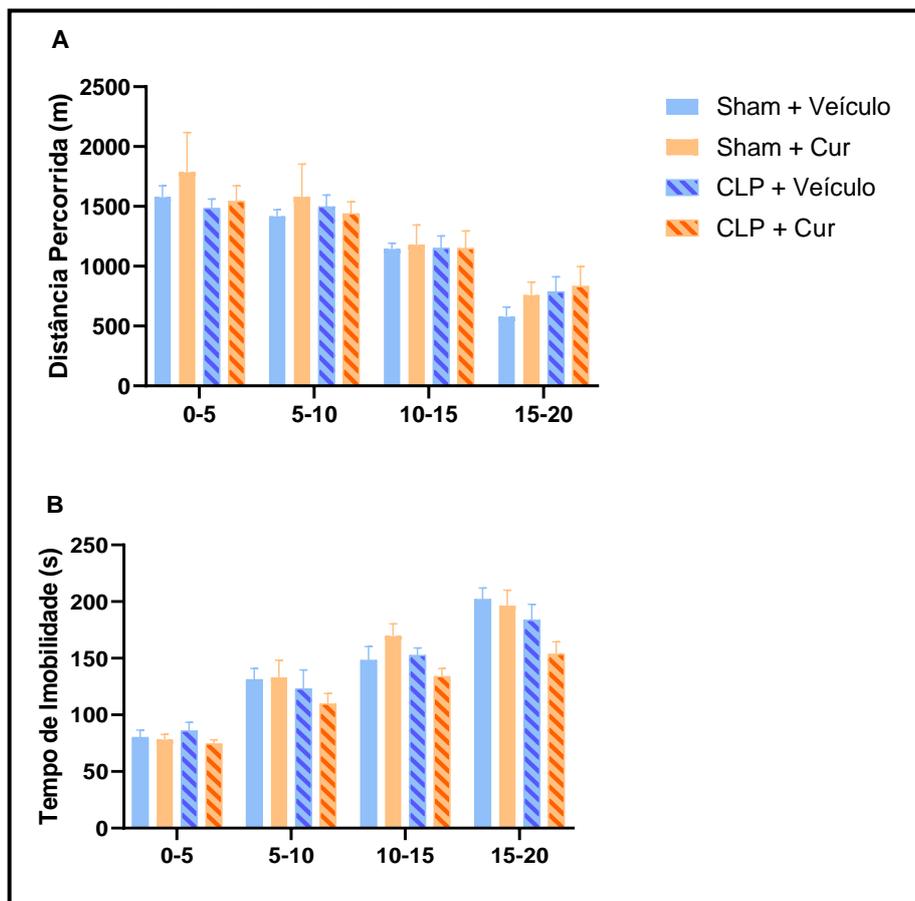
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM CURCUMINA SOBRE O COMPORTAMENTO E O ESTRESSE OXIDATIVO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE

4.3.1 Campo Aberto

A seguir, a Figura 23 mostra o desempenho comportamental em animais submetidos à indução da sepse por ligação e perfuração cecal há 10 dias e posteriormente ao tratamento com curcumina (50 mg/kg, p.o) durante 7 dias consecutivos. Corroborando os dados apresentados na primeira etapa deste estudo, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos testados quanto aos parâmetros distância percorrida (Fig. 23A) e tempo de imobilidade (Fig. 23B).

Em relação ao tempo total de duração do presente teste comportamental (20 minutos), notamos uma redução significativa do comportamento exploratório em todos os grupos testados no tempo final do teste (15-20 minutos) quando comparado ao tempo inicial (0-5 minutos) (Fig. 23A e 23B, $p < 0,0001$) (análises estatísticas – Tabela 11).

Figura 23 – Desempenho comportamental no teste de campo aberto em animais submetidos à indução da sepse por ligação e perfuração cecal e ao tratamento com veículo ou curcumina



Fonte: Autora.

Nota: Em A temos a distância percorrida (cm) e em B, o tempo de imobilidade (s) em animais Sham e CLP tratados com veículo ou curcumina (50 mg/kg, p.o), após simulação ou indução da sepse por ligação e perfuração cecal há 10 dias. Estatística: ANOVA duas vias seguida de teste de Tukey (n = 10): **** $p < 0,0001$. Os tamanhos do efeito foram interpretados como: ausente $\omega^2 \leq 0,01$, pequeno $\omega^2 \geq 0,02$, moderado $\omega^2 \geq 0,06$, grande $\omega^2 \geq 0,14$ e muito grande $\omega^2 \geq 1,15$.

Tabela 11 - Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado no teste de campo aberto, em grupos Sham e CLP tratados com veículo ou curcumina (cirurgia e tratamento), durante 20 minutos (tempo).

Parâmetros	Cirurgia e Tratamento	Tempo	Interação
Distância Percorrida	F (3, 144) = 0,6633 P = 0,5759 $\omega^2 = -1,00$	F (3, 144) = 26,37 P < 0,0001 $\omega^2 = 76,05$	F (9, 144) = 0,3020 P = 0,9731 $\omega^2 = -6,27$
Tempo de Imobilidade	F (3, 144) = 4,921 P = 0,0028 $\omega^2 = 10,27$	F (3, 144) = 70,29 P < 0,0001 $\omega^2 = 181,69$	F (9, 144) = 0,8268 P = 0,5925 $\omega^2 = -1,36$

Fonte: Autora.

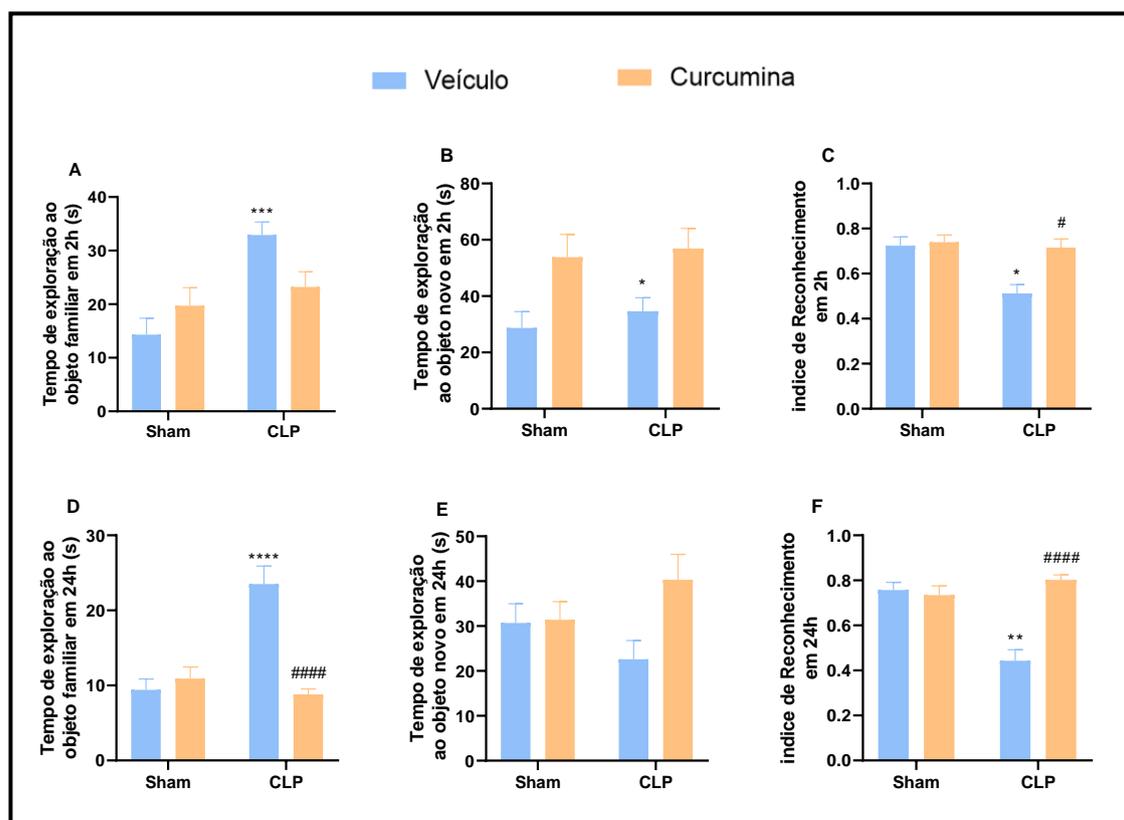
4.3.2 Reconhecimento de Objetos

A seguir, a Figura 24 permite-nos avaliar o desempenho comportamental no teste de reconhecimento de objetos em ratos submetidos à indução da sepse por ligação e perfuração cecal há 10 dias e posteriormente ao tratamento oral com curcumina na dose de 50 mg/kg.

Nota-se em animais do grupo veículo+CLP um aumento significativo do tempo de exploração ao objeto familiar ($p < 0,001$, Fig. 24A) e uma redução dos parâmetros de tempo de exploração ao objeto novo ($p < 0,01$, Fig. 24B) e índice de reconhecimento ($p < 0,01$, Fig. 24C) em 2 horas, quando comparados ao grupo veículo+Sham. Observa-se também, nesses animais, um expressivo aumento no tempo de exploração ao objeto familiar ($p < 0,0001$, Fig. 24D), uma diminuição do tempo de exploração ao objeto novo (Fig. 24E) e uma redução significativa do índice de reconhecimento ($p < 0,001$, Fig. 24F) em 24h, quando comparados ao grupo controle.

Podemos notar ainda, que após 10 dias da indução da sepse os animais tratados com curcumina apresentaram uma redução do tempo de exploração ao objeto familiar (Fig. 24A) e um aumento dos parâmetros tempo de exploração ao objeto novo (Fig. 24B) e índice de reconhecimento ($p < 0,01$, Fig. 24C) em 2 horas, quando comparados ao grupo CLP+veículo. Em 24 horas, observamos um efeito ainda mais expressivo do tratamento com curcumina em animais CLP, uma vez que o tempo de exploração ao objeto familiar apresentou-se significativamente reduzido ($p < 0,00001$, Fig. 24D) e os parâmetros de tempo de exploração ao objeto novo e índice de reconhecimento significativamente aumentados ($p < 0,00001$, Fig. 24E e Fig. 24F respectivamente), quando comparados ao grupo CLP+Veículo (análises estatísticas – Tabela 12).

Figura 24 – Desempenho comportamental no teste de reconhecimento de objetos em animais submetidos à indução da sepse por ligação e perfuração cecal e ao tratamento com veículo ou curcumina



Fonte: Autora.

Nota: Em A, B e C temos respectivamente os parâmetros tempo de exploração ao objeto familiar (s), o tempo de exploração ao objeto novo (s) e índice de reconhecimento em 2 horas. Em D, E e F temos respectivamente os parâmetros tempo de exploração ao objeto familiar (s), o tempo de exploração ao objeto novo (s) e índice de reconhecimento em 24 horas em animais Sham e CLP tratados com veículo ou curcumina (50 mg/kg, p.o), após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal há 10 dias. Estatística: ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey (n = 10): * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ e **** $p < 0,0001$ comparados ao grupo Sham+veículo, # $p < 0,01$ e ##### $p < 0,0001$ comparados ao grupo CLP+veículo. Os tamanhos do efeito foram interpretados como: ausente $\omega^2 \leq 0,01$, pequeno $\omega^2 \geq 0,02$, moderado $\omega^2 \geq 0,06$, grande $\omega^2 \geq 0,14$ e muito grande $\omega^2 \geq 1,15$.

Tabela 12 - Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado no teste de reconhecimento de objetos, em grupos Sham e CLP (cirurgia) tratados com veículo ou curcumina (tratamento).

Parâmetros	Cirurgia	Tratamento	Interação
Tempo de exploração ao objeto familiar 2h	F (1, 36) = 13,90 P = 0,0007 $\omega^2 = 8,93$	F (1, 36) = 0,5262 P = 0,4729 $\omega^2 = -0,32$	F (1, 36) = 6,488 P = 0,0153 $\omega^2 = 3,80$
Tempo de exploração ao objeto novo 2h	F (1, 36) = 0,4660 P = 0,4992 $\omega^2 = -0,99$	F (1, 36) = 12,93 P = 0,0561 $\omega^2 = -0,97$	F (3, 72) = 0,3413 P = 0,7956 $\omega^2 = -0,99$
Índice de Reconhecimento 2h	F (1, 34) = 5,520 P = 0,0248 $\omega^2 = 0,003$	F (1, 34) = 3,576 P = 0,0672 $\omega^2 = 0,002$	F (1, 34) = 4,336 P = 0,0449 $\omega^2 = 0,001$
Tempo de exploração ao objeto familiar 24h	F (1, 36) = 13,21 P = 0,0009 $\omega^2 = 5,49$	F (1, 36) = 15,98 P = 0,0003 $\omega^2 = 6,16$	F (1, 36) = 24,07 P < 0,0001 $\omega^2 = 9,49$
Tempo de exploração ao objeto novo 24h	F (1, 36) = 0,007604 P = 0,9310 $\omega^2 = -0,83$	F (1, 36) = 4,022 P = 0,0525 $\omega^2 = 2,55$	F (1, 36) = 3,434 P = 0,0721 $\omega^2 = 2,05$
Índice de Reconhecimento 24h	F (1, 34) = 3,993 P = 0,0537 $\omega^2 = 0,003$	F (1, 34) = 16,27 P = 0,0003 $\omega^2 = 0,006$	F (1, 34) = 15,29 P = 0,0004 $\omega^2 = 0,008$

Fonte: Autora.

4.3.3 Labirinto Aquático de Morris

A seguir, a Figura 25 permite a avaliação da performance comportamental no teste de labirinto aquático de Morris de ratos machos adultos submetidos à indução da sepse por ligação e perfuração cecal há 10 dias e posteriormente ao tratamento com curcumina (50 mg/kg, p.o).

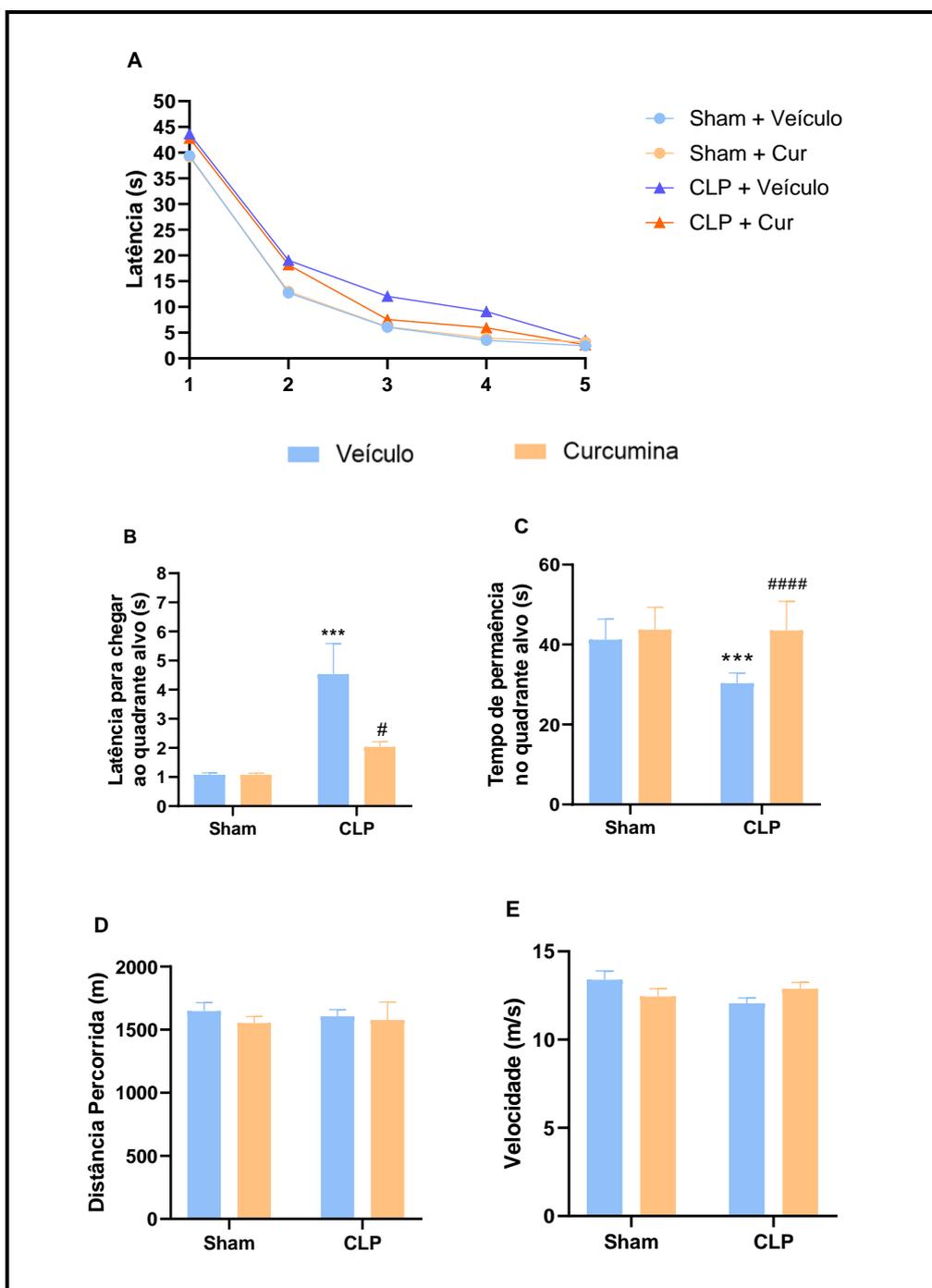
Observa-se no parâmetro latência que apenas os animais do grupo CLP+veículo apresentaram um aumento do tempo para chegar à plataforma durante os 5 dias da etapa de treino, quando comparados ao grupo controle (Fig. 25A). Além disso, no dia do teste, notamos nesses animais um aumento significativo da latência para chegar ao quadrante alvo

($p > 0,0001$, Fig. 25B) e uma redução do tempo gasto no quadrante alvo ($p > 0,0001$, Fig. 25C), quando comparados ao grupo Sham+veículo.

Contudo, ao receberem o tratamento com curcumina, os animais CLP apresentaram uma diminuição da latência durante a etapa de treinos (Fig. 25A), quando comparados ao grupo controle. Além disso, nota-se no dia do teste uma diminuição da latência para chegar ao quadrante alvo ($p > 0,01$, Fig. 25B) e um aumento do tempo gasto no mesmo ($p > 0,00001$, Fig. 25C) quando comparado ao grupo CLP+veículo.

Quanto aos parâmetros distância percorrida e velocidade, como esperado, não observamos diferença estatisticamente significativa em todos os grupos testados (Fig. 25D e 25E, respectivamente). Esses resultados reforçam a ausência de prejuízo locomotor em animais Sham e CLP tratados com veículo ou curcumina observada anteriormente no teste de campo aberto (análises estatísticas – Tabelas 13 e 14).

Figura 25 – Performance comportamental no teste de labirinto aquático de Morris em animais submetidos à indução da sepse por ligação e perfuração cecal e ao tratamento com veículo ou curcumina



Fonte: Autora.

Nota: Em A temos a latência (s) da etapa de treinos, em B a latência para chegar no quadrante alvo (s), em C o tempo gasto no quadrante alvo (s), em D a distância percorrida (m) e em E a velocidade (m/s) em animais Sham e CLP tratados com veículo ou curcumina (50 mg/kg, p.o), após simulação ou indução da sepse por ligação e perfuração cecal há 10 dias. Estatística: ANOVA de duas vias seguida de teste de Tukey (n = 10): *** $p < 0,0001$ e **** $p < 0,0001$ comparados ao grupo controle, ## $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ comparado ao grupo CLP+veículo. Os tamanhos do efeito foram interpretados como: ausente $\omega^2 \leq 0,01$, pequeno $\omega^2 \geq 0,02$, moderado $\omega^2 \geq 0,06$, grande $\omega^2 \geq 0,14$ e muito grande $\omega^2 \geq 1,15$.

Tabela 13 - Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado no teste de labirinto aquático de Morris, em grupos Sham e CLP tratados com veículo ou curcumina (cirurgia e tratamento) durante 5 dias (tempo).

Parâmetro	Cirurgia e Tratamento	Tempo	Interação
Latência	F (3, 180) = 2,485 P = 0,0622 $\omega^2 = 1,44$	F (4, 180) = 101,5 P < 0,0001 $\omega^2 = 130,63$	F (12, 180) = 0,1904 P = 0,9987 $\omega^2 = -3,15$

Fonte: Autora.

Tabela 14 - Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado no teste de labirinto aquático de Morris, em grupos Sham e CLP (cirurgia) tratados com veículo ou curcumina (tratamento).

Parâmetros	Cirurgia	Tratamento	Interação
Latência para chegar ao quadrante alvo	F (1, 36) = 17,15 P = 0,0002 $\omega^2 = 1,09$	F (1, 36) = 5,488 P = 0,0246 $\omega^2 = 0,30$	F (1, 36) = 5,488 P = 0,0248 $\omega^2 = 0,30$
Tempo de permanência no quadrante alvo	F (1, 35) = 9,989 P = 0,0032 $\omega^2 = 3,96$	F (1, 35) = 20,10 P < 0,0001 $\omega^2 = 8,41$	F (1, 35) = 9,351 P = 0,0043 $\omega^2 = 3,68$
Distância Percorrida	F (1, 36) = 0,01041 P = 0,9193 $\omega^2 = -0,98$	F (1, 36) = 0,5146 P = 0,4778 $\omega^2 = -0,48$	F (1, 36) = 0,1431 P = 0,7074 $\omega^2 = -0,85$
Velocidade	F (1, 36) = 1,228 P = 0,2752 $\omega^2 = 0,009$	F (1, 36) = 0,01794 P = 0,8942 $\omega^2 = -0,04$	F (1, 36) = 4,646 P = 0,0379 $\omega^2 = 0,20$

Fonte: Autora.

4.3.4 Estresse Oxidativo

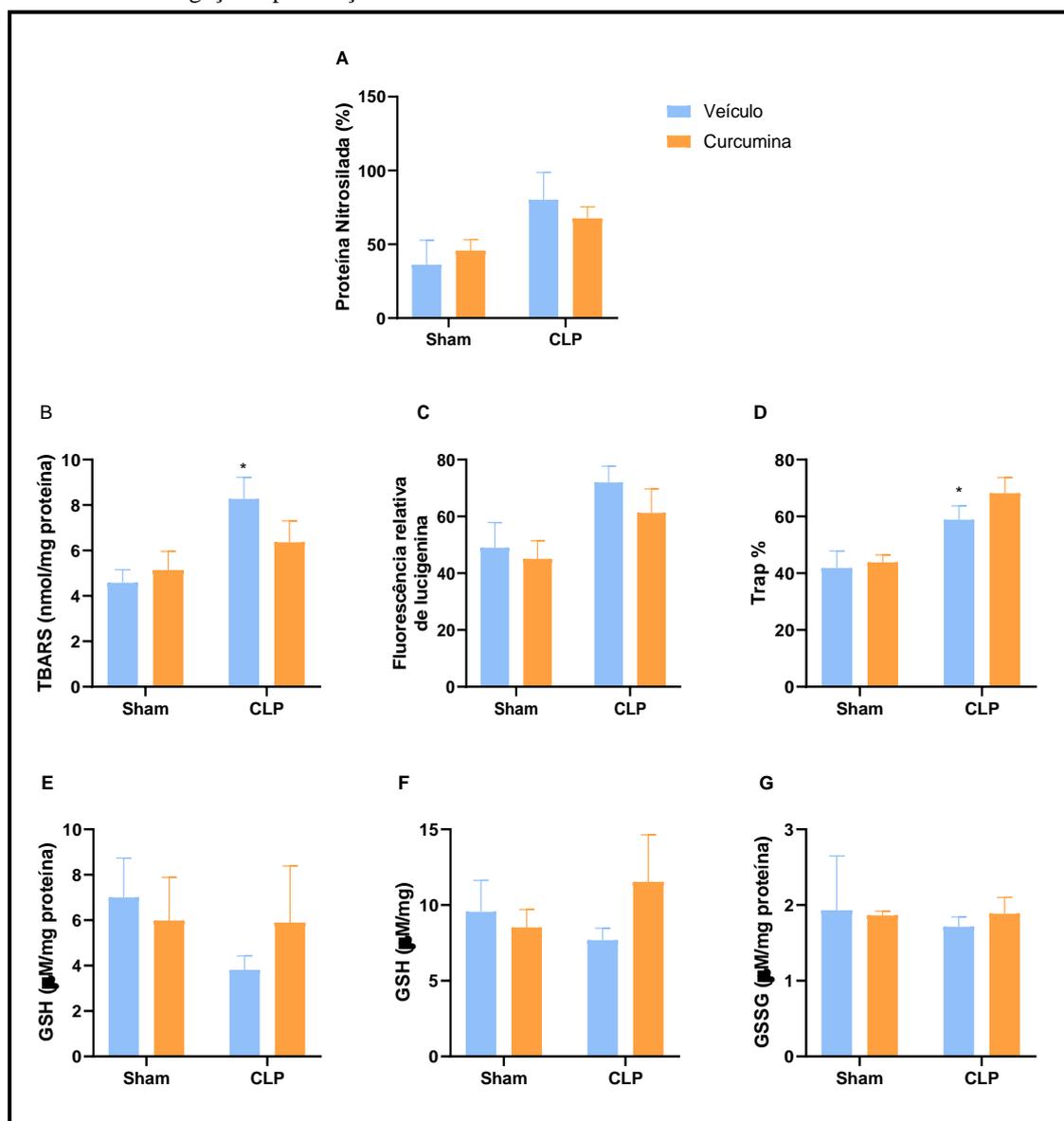
A seguir, a figura 26 representa a concentração hipocampal dos parâmetros oxidativos sendo eles: nitrosilação de proteínas, TBARS e fluorescência relativa de lucigenina (Fig. 26A, 26B e 26C respectivamente) e antioxidativos Trap, GSH livre, GSH total e GSSG (Fig. 26D, 26E, 26F e 26G respectivamente) em ratos adultos submetidos a indução da sepse por ligação e perfuração cecal há 10 dias e posteriormente ao tratamento com curcumina (50mg/Kg, p.o).

Observa-se em animais do grupo CLP+veículo um aumento expressivo de nitrosilação de proteínas (Fig.26A), TBARS (p<0,01, Fig.26B) e fluorescência de lucigenina (Fig. 26C), enquanto a porcentagem de trap (p<0,001, Fig. 26D) e os níveis de GSH livre e

total (Fig. 26E e 26F, respectivamente) apresentaram-se reduzidos quando comparado ao grupo controle.

Além disso, é possível notar em animais do grupo CLP+curcumina uma redução significativa dos níveis de nitrosilação proteica, TBARS e fluorescência de lucigenina (Fig 26B e 26C, respectivamente), bem como um aumento expressivo da porcentagem de Trap e dos níveis de GSH livre e total (Fig. 26D, 26E e 26F, respectivamente) quando comparado ao grupo CLP+veículo. Quanto ao parâmetro GSSG (Fig. 26G), não encontramos diferenças significativamente estatísticas entre os grupos testados (Análises estatísticas – Tabela 15).

Figura 26 – Análise dos perfis oxidativo e antioxidativo em animais submetidos à indução da sepse por ligação e perfuração cecal e ao tratamento com veículo ou curcumina



Fonte: Autora.

Nota: Em A temos o nível de nitrosilação de proteínas, em B o nível de TBARS, em C o nível de fluorescência relativa de lucigenina, em D a porcentagem de Trap, em E o nível de GSH livre, em F o nível de GSH total e em G o nível de GSSG em animais Sham e CLP tratados com veículo ou curcumina (50 mg/kg, p.o), após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal há 10 dias. Estatística: ANOVA de duas vias seguida de teste de Tukey (n = 3-7): * $p < 0,01$ comparado ao grupo controle. Os tamanhos do efeito foram interpretados como: ausente $\omega^2 \leq 0,01$, pequeno $\omega^2 \geq 0,02$, moderado $\omega^2 \geq 0,06$, grande $\omega^2 \geq 0,14$ e muito grande $\omega^2 \geq 1,15$.

Tabela 15 - Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado dos perfis oxidativo e antioxidativo, em grupos Sham e CLP (cirurgia) tratados com veículo ou curcumina (tratamento).

Parâmetros	Cirurgia	Tratamento	Interação
Nitrosilação de proteínas (NO)	F (1, 11) = 7,569 P = 0,0189 $\omega^2 = 6,39$	F (1, 11) = 0,01646 P = 0,9002 $\omega^2 = -0,95$	F (1, 11) = 0,8646 P = 0,3724 $\omega^2 = -0,13$
TBARS	F (1, 16) = 0,5839 P = 0,4559 $\omega^2 = 1,05$	F (1, 16) = 7,813 P = 0,0130 $\omega^2 = -0,06$	F (1, 16) = 1,964 P = 0,1802 $\omega^2 = 0,14$
Fluorescência de lucigenina (ROS)	F (1, 19) = 0,8203 P = 0,3764 $\omega^2 = 4,55$	F (1, 19) = 5,827 P = 0,0260 $\omega^2 = -0,16$	F (1, 19) = 0,1759 P = 0,6797 $\omega^2 = -0,77$
TRAP	F (1, 17) = 1,306 P = 0,2690 $\omega^2 = 14,11$	F (1, 17) = 17,31 P = 0,0007 $\omega^2 = 0,26$	F (1, 17) = 0,5443 P = 0,4707 $\omega^2 = -0,39$
GSH livre	F (1, 16) = 0,09208 P = 0,7655 $\omega^2 = -0,05$	F (1, 16) = 0,8655 P = 0,3660 $\omega^2 = -0,40$	F (1, 16) = 0,7717 P = 0,3927 $\omega^2 = -0,10$
GSH total	F (1, 18) = 0,4142 P = 0,5279 $\omega^2 = -0,50$	F (1, 18) = 0,06927 P = 0,7954 $\omega^2 = -0,31$	F (1, 18) = 1,265 P = 0,2755 $\omega^2 = 0,14$
GSSG	F (1, 16) = 0,01207 P = 0,9139 $\omega^2 = -0,05$	F (1, 16) = 0,04223 P = 0,8398 $\omega^2 = -0,05$	F (1, 16) = 0,06288 P = 0,8052 $\omega^2 = -0,04$

Fonte: Autora

5 DISCUSSÃO

A seguir serão discutidos os resultados encontrados em nosso estudo.

5.1 AVALIAÇÃO TEMPORAL DO COMPORTAMENTO COGNITIVO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE

A sepsé é caracterizada por um conjunto de reações sistêmicas não contidas localmente pelo sistema imune do hospedeiro em resposta ao agente infeccioso. O seu desfecho clínico induz lesões múltiplas de órgãos, sendo o cérebro primordialmente afetado. A intensa comunicação entre o sistema imunológico periférico e o SNC induz a perda da seletividade da BHE, culminando em severos processos inflamatórios e oxidativos no cérebro. Em consequência disso, é possível observar a morte de neurônios e um acentuado prejuízo das funções cognitivas (DAL-PIZZOL; TOMASI; RITTER, 2014; TSURUTA; ODA, 2016; MOLNAR *et al.*, 2018).

Os mecanismos envolvidos nos déficits de memória e cognição induzidos pela sepsé ainda são pouco compreendidos. Por isso, os modelos animais de sepsé experimental fazem-se necessários, uma vez que permitem o melhor esclarecimento da fisiopatologia envolvida entre a sepsé e suas sequelas. Nesse sentido, escolhemos o modelo clínico de ligadura e perfuração cecal para explorar os mecanismos envolvidos no prejuízo cognitivo advindos da sepsé. Por ser um procedimento simples, o CLP tem sido abordado como uma boa ferramenta translacional para induzir a sepsé experimental, dado que gera uma peritonite seguida pela translocação polimicrobiana na corrente circulatória (JORDÃO *et al.*, 2019; BARICHELLO *et al.*, 2019; PARKER; WATKINS, 2001).

Quanto ao comportamento, existe uma variedade de testes que nos permite avaliar possíveis alterações na memória e cognição em roedores. Em nosso estudo, optamos pelos testes comportamentais de reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris, visto que são descritos como metodologias simples e eficazes para estudar o desempenho cognitivo em animais sobreviventes à sepsé induzida por CLP. Além disso, realizamos avaliações comportamentais não cognitivas no teste de campo aberto, uma vez que alterações motoras podem comprometer o desempenho cognitivo dos animais (BARICHELLO *et al.*, 2005; MANFREDINI *et al.*, 2019; ZHUANG *et al.*, 2020).

O teste de campo aberto é comumente utilizado para avaliar o comportamento exploratório em roedores. Os nossos resultados obtidos a partir desse teste mostram que a sepse não foi capaz de induzir prejuízo locomotor/exploratório em animais CLP sobreviventes à sepse em nenhum dos dias testados.

Bedirli *et al.* (2018) também demonstraram temporalmente a normalidade na atividade locomotora em ratos *Wistar* sobreviventes à sepse induzida por CLP no teste de campo aberto. Os achados de Wang *et al.* (2020) mostram, em camundongos sobreviventes à sepse, a ausência de prejuízo locomotor no teste de campo aberto em 1, 7 e 14 dias após a indução da sepse por CLP, reforçando os dados apresentados no estudo anterior.

Calsavara *et al.* (2013) evidenciaram, em camundongos sobreviventes à sepse induzida por CLP e posteriormente submetidos ao teste de campo aberto, a ausência de déficits exploratórios 10 dias após a cirurgia. Esse dado corrobora os resultados obtidos no trabalho de Tuon *et al.* (2007), que também mostram uma regularidade da atividade exploratória em ratos submetidos à sepse induzida por CLP há 10 dias. Comim *et al.* (2009) verificaram que o comportamento exploratório em animais CLP melhora gradualmente entre 24 e 48 horas após a indução da sepse, confirmando a inexistência de deficiência da capacidade locomotora e exploratória em animais sobreviventes à sepse induzida por CLP.

No que diz respeito ao comportamento cognitivo, avaliamos em animais sobreviventes à sepse a capacidade de memorizar diferentes objetos em curto e longo prazo por meio do teste de reconhecimento de objetos. Observamos, em animais CLP sobreviventes à sepse há 10 dias, um aumento significativo do parâmetro tempo de exploração ao objeto familiar e uma redução dos parâmetros tempo de exploração ao objeto novo e índice de reconhecimento, em 2 e 24 horas, quando comparados ao grupo controle. Esses achados sugerem um acentuado declínio nas memórias de reconhecimento de curta (2h) e longa duração (24h) em animais sobreviventes à sepse.

Embora o tamanho do efeito relacionado aos parâmetros tempo de exploração aos objetos familiar e novo em 2h e 24h tenha sido pequeno em animais CLP sobreviventes à sepse induzida há 20 dias, houve uma queda moderada do índice de reconhecimento em curto e longo prazo. Esses achados são compatíveis a um déficit moderado na memória de reconhecimento de curta e longa duração, quando comparados aos ratos Sham. Quanto à memória de reconhecimento em roedores CLP sobreviventes à sepse há 30 dias, não notamos uma incapacidade em reconhecer objetos em 2h e 24h, quando comparados ao grupo controle. Em conjunto, esses dados permitem-nos inferir que a inflamação sistêmica pode

culminar em danos persistentes à memória de reconhecimento de curto e longo prazo em animais sobreviventes à sepse induzida por CLP.

Similarmente, Tuon *et al.* (2008) demonstraram a melhora tempo-dependente da memória em ratos sobreviventes à sepse induzida por CLP, a qual foi avaliada pelos testes de reconhecimento de objetos e esquia inibitória. Conforme os achados dos autores, os animais CLP apresentaram um acentuado declínio cognitivo em ambos os testes 10 dias após a indução da sepse, quando comparados ao grupo Sham. Já em animais CLP avaliados no 30º dia após o início da sepse, observou-se um pequeno prejuízo nas memórias testadas em comparação ao grupo controle. Este declínio, por sua vez, tornou-se imperceptível nesses animais 60 dias após a indução da sepse.

Esses dados corroboram os achados de Michelon *et al.* (2019), os quais evidenciaram em roedores submetidos à sepse induzida por CLP o comprometimento da memória aversiva no teste de esquia inibitória 10 dias após a indução do evento séptico. Além disso, assim como nos demais estudos, os autores reafirmaram a presença de déficit das memórias testadas de forma atenuada em animais sobreviventes há 30 dias após a indução da sepse.

Moraes *et al.* (2014) realizaram o teste de reconhecimento de objetos em roedores sobreviventes a sepse induzida por CLP e uma significativa redução do índice de reconhecimento foi constatada 9 dias após a indução da sepse. Porém, não foi observada diferença no indicador de memória de reconhecimento entre os grupos CLP e Sham 30 dias após a indução da sepse, indicando um resgate da memória de longo prazo (24h).

Olivieri *et al.* (2018) mostraram, em ratos *Wistar* idosos sobreviventes à sepse induzida por CLP, a presença de prejuízo na função cognitiva de reconhecimento de longo prazo, a qual foi avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos 90 dias após a indução da sepse. O declínio da memória de reconhecimento em animais sépticos foi acompanhado pela presença expressiva de A β e pelo aumento dos níveis de IL-1 β e IL-6 no córtex pré-frontal. Além disso, foram encontrados níveis aumentados de TNF- α e IL-1 β e da atividade da mieloperoxidase no hipocampo destes animais. Esses achados foram associados ao aumento da ativação microglial induzida pela sepse, a qual foi constatada pelo aumento da expressão da proteína adaptadora de cálcio ionizada 1 (Iba1). Segundo os autores, neste caso, os déficits cognitivos de longo prazo em animais CLP sobreviventes mantiveram-se presentes devido à persistência da inflamação sistêmica e ao aumento progressivo da deposição de A β no hipocampo, os quais foram somados ao efeito do envelhecimento fisiológico.

Segundo Olivieri *et al.* (2018) a inflamação sistêmica está intimamente associada ao aumento dos níveis de A β no SNC, o que leva a prejuízos na discriminação de objetos de curto e longo prazo em animais sobreviventes à sepse. As A β desencadeiam a ativação do receptor para glicação avançada de produtos finais (RAGE), evento esse classificado como importante na progressão da morte de neurônios.

A capacidade cognitiva dos roedores em aprender localizações espaciais pode ser avaliada pelo teste de labirinto aquático de Morris. Frente a isso, nós o utilizamos para investigar se a memória e cognição espacial em animais sobreviventes à sepse induzida por CLP também se encontrava prejudicada. Os nossos achados mostram, em ratos sobreviventes à sepse induzida há 10 dias, um aumento significativo da latência de aprendizagem durante os 5 dias da etapa de treino. Observamos também um aumento expressivo da latência para chegar ao quadrante alvo, bem como uma redução do tempo de permanência no mesmo no dia do teste, em comparação aos animais Sham.

Já em animais CLP testados 20 dias após a indução da sepse, notamos apenas um aumento da latência para alcançar a plataforma no segundo dia de treino, quando comparado ao grupo controle. Embora tenham apresentado uma leve dificuldade para aprender a chegar à plataforma, esses animais não apresentaram prejuízo na memória espacial no dia do teste. Quanto aos animais testados 30 dias após a indução da sepse, não observamos nenhum comprometimento na aprendizagem ou memória espacial. Portanto, esses dados permitem-nos sugerir que a sepse é capaz de induzir danos à memória espacial, os quais também são atenuados conforme o decorrer do tempo. Quanto aos parâmetros distância percorrida e velocidade, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos Sham e CLP em todos os dias testados. Esses dados reforçam a ausência de prejuízo locomotor em animais submetidos à sepse induzida por CLP, a qual foi demonstrada anteriormente pelo teste de campo aberto.

Em conjunto, os nossos dados reafirmam os achados de Hernandes *et al.* (2014), que demonstraram um acentuado prejuízo na memória espacial no teste de labirinto aquático de Morris em 6h, 24h e 5 dias após a cirurgia em camundongos submetidos ao modelo de sepse induzida por CLP comparados ao grupo Sham. Segundo os autores, o déficit na memória espacial poderia estar relacionado ao intenso estresse oxidativo gerado pela sepse no hipocampo de animais sépticos.

Similarmente, Shen *et al.* (2020) mostraram, em camundongos sobreviventes à sepse induzida por CLP há 9 dias, uma dificuldade em aprender a localização da plataforma

durante os 5 dias da etapa de treino do teste de labirinto aquático de Morris. Esse prejuízo cognitivo foi acompanhado por um déficit significativo da memória espacial no dia do teste, evidenciado pelo aumento expressivo do tempo de latência de chegada ao quadrante alvo e pela diminuição do tempo gasto no mesmo quando comparado ao grupo controle. Além disso, foram exibidos níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 no hipocampo desses animais, o que pode estar relacionado à perda da capacidade cognitiva espacial.

Luo *et al.* (2020) também mostraram, em camundongos sépticos, um aumento do tempo de latência na etapa de treino e do tempo gasto no quadrante alvo no dia do teste, indicando uma perda da capacidade de localização espacial. Esses efeitos foram associados ao aumento de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo de animais sobreviventes à sepse induzida por CLP.

O estudo de Tian *et al.* (2019) comprovou mais uma vez que a sepse é capaz de induzir um dano significativo na memória espacial em roedores sépticos sobreviventes. Assim como nos estudos anteriores, tal dano foi acompanhado periféricamente pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-4, IL-6 e TNF- α e pelo aumento do estresse oxidativo, redução da atividade da citrato sintase (enzima que controla o primeiro passo do ciclo de Krebs), bem como pelo aumento de morte neuronal na região CA3 do hipocampo.

A morte celular em regiões hipocampais é uma das causas primordiais de prejuízos na memória de longo prazo. Yin *et al.* (2020) observaram uma redução significativa da memória aversiva, evidenciada pela diminuição do tempo de congelamento no teste de condicionamento ao medo, em camundongos submetidos à sepse induzida por CLP há 13 e 14 dias, quando comparados ao grupo controle. A disfunção cognitiva foi evidenciada em animais sobreviventes à sepse junto à redução de todos os marcadores de regulação de neurogênese testados pelos autores no hipocampo, bem como ao aumento da expressão de GFAP.

O estudo de Yokoo *et al.* (2012) comprovou a morte de neurônios hipocampais 12 e 24 horas após a indução da sepse por CLP em camundongos devido ao aumento da permeabilidade da BHE, do estresse oxidativo e da resposta inflamatória, evidenciada pelo aumento da expressão dos genes da GFAP e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β .

Embora o hipocampo não seja o local onde as memórias são armazenadas, ele exerce um papel crucial na formação de novas memórias e em sua subsequente reativação. Essa região possui uma capacidade limitada de adquirir informações de forma rápida e

automática, sem mantê-las por muito tempo. Entretanto, com o decorrer do tempo, a informação originalmente disponível torna-se permanente para outras estruturas cerebrais, como o córtex, independentemente da atividade hipocampal (CINELLI *et al.*, 2020; SEONG *et al.*, 2016; VALERO *et al.*, 2014).

O principal mecanismo dessa transferência de informações é a reativação (repetição) das configurações da atividade neuronal. Em outras palavras, o hipocampo e as estruturas temporais mediais a ele ligadas são imprescindíveis para o desempenho do evento como um todo, uma vez que dispersa de forma organizada os traços de memória. Essa reativação orientada pelo hipocampo induz a criação de conexões diretas entre os neurônios corticais, culminando na formação de novas memórias visuais e da função de organização da memória espacial (CASCELLA; KHALILI, 2021).

Em suma, os dados apresentados em nosso estudo, obtidos a partir de ratos sobreviventes à sepse induzida por ligadura e perfuração cecal, mostraram, em diferentes dias, uma normalidade da capacidade locomotora/exploratória nos testes de campo aberto e labirinto aquático de Morris. Mesmo assim, esses animais demonstraram um aumento do tempo de exploração ao objeto familiar, uma diminuição do tempo de exploração ao objeto novo e do índice de reconhecimento em 2 e 24h no teste de reconhecimento de objetos, um aumento dos tempos de latência e para chegar ao quadrante alvo e uma redução do tempo de permanência no mesmo no teste de labirinto aquático de Morris.

Além disso, demonstramos que o ápice dos prejuízos de memória e cognição ocorreu 10 dias após a indução da sepse e que os mesmos permaneceram de forma tempo-dependente a essa condição clínica. Frente a isso, escolhemos o décimo dia para avaliar o efeito da curcumina sobre as alterações cognitivas e neurodegenerativas induzidas pela sepse, uma vez que nesse dia foi possível observar os parâmetros mencionados significativamente alterados, justificando a exclusão dos demais dias testados. Portanto, os nossos achados reafirmam a capacidade da sepse em produzir efeitos característicos aos prejuízos cognitivo e de memória.

5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM CURCUMINA SOBRE AS ALTERAÇÕES COGNITIVAS E O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS PELA SEPSE

Após definirmos o décimo dia para avaliar o efeito da curcumina sobre as alterações cognitivas e neurodegenerativas induzidas pela sepse, selecionamos, a partir de um estudo prévio de nosso laboratório, a dose de 50 mg/kg para ser administrada por gavagem nos animais (REIS, 2018).

Há na literatura um significativo número de trabalhos científicos cujo objetivo é evidenciar o papel neuroprotetor da curcumina. Porém, estudos que abordem conjuntamente o tratamento com curcumina, déficits cognitivos e sepse induzida por CLP ainda permanecem escassos. Entretanto, é possível encontrar trabalhos que demonstram o efeito deste composto sobre os déficits cognitivos em outros modelos experimentais. Diante disso, o presente estudo faz-se importante, pois é o primeiro a investigar os efeitos do tratamento prolongado com curcumina na dose de 50 mg/kg sobre o comportamento cognitivo em animais sobreviventes à sepse induzida por CLP utilizando os testes comportamentais de campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris (AKINYEMI et al., 2018; BAGHBADERANI et al., 2021; SCAPAGNINI et al., 2011; KHAN et al., 2018).

Como esperado, em nosso estudo não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos testados no teste de campo aberto, sugerindo ausência de comprometimento locomotor/exploratório em animais Sham e CLP tratados com veículo ou curcumina. Os achados de Bassani *et al.* (2017) são similares ao nosso, uma vez que mostram a ausência de deficiência locomotora em ratos *Wistar* machos submetidos a um modelo de DA e posteriormente ao tratamento por gavagem com veículo ou curcumina nas doses de 25, 50 ou 100 mg/kg durante 30 dias consecutivos.

Corroborando o estudo anterior, Mei *et al.* (2020) evidenciaram a ausência de alteração motora em camundongos controle e transgênicos para DA (APP/PS1) submetidos aos tratamentos intracerebroventricular (i.c.v) ou por gavagem com veículo ou curcumina nas doses de 0,6 mg/ μ l ou 0,1 mg/g, respectivamente, durante 7 dias. As investigações de Moretti *et al.* (2021), realizadas em um modelo experimental de déficit cognitivo induzido por doxorrubicina, também não apontaram mudança na atividade locomotora/exploratória em animais controle e submetidos ao tratamento crônico com veículo ou curcumina (100 mg/kg, v.o), reforçando mais uma vez os nossos dados.

Em nossos achados para o teste de reconhecimento de objetos, os animais tratados com curcumina na dose de 50 mg/kg (p.o) apresentaram uma redução do tempo de exploração ao objeto familiar e um aumento do tempo de exploração ao objeto novo e do índice de reconhecimento em curto e longo prazo 10 dias após a indução da sepse por CLP, sugerindo a melhora da memória de reconhecimento nesses animais.

Os nossos dados corroboram os achados de outros modelos experimentais, os quais também evidenciaram a melhora da memória de reconhecimento após o tratamento com curcumina. Moretti *et al.* (2021) notaram, em animais submetidos ao pré-tratamento com doxorubicina, uma disfunção cognitiva na tarefa de discriminação de objetos, identificada pelo aumento do tempo de exploração ao objeto familiar e redução dos parâmetros tempo de exploração ao objeto novo e índice de reconhecimento de curto e longo prazo no teste de reconhecimento de objetos. Todavia, foi observado que o tratamento com curcumina (100 mg/kg, v.o) foi capaz de atenuar o prejuízo da memória de reconhecimento induzido pela doxorubicina. Kodali *et al.* (2018) mostraram um resultado semelhante em ratos *Sprague Dawley* submetidos à exposição diária a produtos químicos relacionados a doença da Guerra do Golfo e a 5 minutos de estresse de contenção por 28 dias, os quais receberam posteriormente o tratamento i.p com curcumina (30 mg/kg) durante 30 dias.

Jaques *et al.* (2013) investigaram, em ratos *Wistar*, a possível ação protetora da curcumina contra o comprometimento cognitivo induzido por fumaça de cigarro. Os animais foram pré-tratados por gavagem com curcumina livre (nas doses de 12,5, 25 ou 50 mg/kg) ou nanoencapsulada (4 mg/kg) e posteriormente submetidos à fumaça de cigarro uma vez ao dia, por 5 dias na semana durante 30 dias. A exposição à fumaça prejudicou significativamente a memória de reconhecimento de curto e longo prazo, apontada pelo baixo índice de reconhecimento no teste de reconhecimento de objetos, quando comparado aos respectivos grupos controle. Contudo, ambos os tratamentos com as formulações de curcumina (livre e nanoencapsulada) foram capazes de prevenir o prejuízo cognitivo observado na discriminação de objetos.

Similarmente, El-ezz *et al.* (2018) exploraram os efeitos de melhora da memória de reconhecimento por meio dos tratamentos com curcumina e Trans-cinamaldeído (CNM) sobre a neuroinflamação induzida por LPS em camundongos. A curcumina e o CNM foram administrados intraperitonealmente, na dose de 50 mg/kg, 3 horas após uma única injeção de LPS (0,8 mg/kg, i.p), e a administração continuou diariamente por 7 dias. Os resultados evidenciados no teste de reconhecimento de objetos mostraram que ambos os compostos

foram capazes de melhorar significativamente o prejuízo de longo prazo da discriminação de objetos induzido pelo LPS.

Em um modelo de isquemia cerebral, onde foi observado um aumento no *score* de comprometimento neurológico e uma redução acentuada da discriminação de objetos novos no teste de reconhecimento de objetos, os tratamentos p.o de curto e longo prazo com curcumina nas doses de 50 ou 100 mg/kg foram capazes de reverter o prejuízo cognitivo no teste de reconhecimento de novos objetos (DOLATABADI *et al.*, 2019).

De forma semelhante, Bassani *et al.* (2017) evidenciaram, em um estudo comportamental por meio do teste de reconhecimento de objetos realizado 60 dias após o tratamento crônico com curcumina em diferentes doses, a recuperação da função cognitiva de longo prazo prejudicada pela administração i.c.v de A β . Os achados de Gutierrez *et al.* (2021) corroboram o estudo anterior, uma vez que os autores demonstraram que a infusão i.c.v de A β causou déficits de memória de longo prazo nos testes de reconhecimento de objetos e esQUIVA inibitória em camundongos. Contudo, ao tratar esses animais por 12 dias alternados por gavagem com curcumina (10 mg/kg) e meloxicam (5 mg/kg) conjuntamente, notou-se a prevenção da perda cognitiva de longo prazo induzida por A β .

Quanto ao uso da curcumina no teste de labirinto aquático de Morris para avaliação da memória espacial, observamos, em animais CLP tratados com curcumina (50 mg/kg, p.o) uma melhora da latência durante os 5 dias da etapa de treinos, bem como uma redução da latência de chegada ao quadrante alvo com consequente aumento do tempo gasto no mesmo, quando comparado ao grupo CLP+veículo. Esses resultados sugerem que o tratamento com curcumina foi capaz de atenuar os prejuízos da memória espacial ocasionados pela sepse.

Baghbaderan *et al.* (2020) exibiram um significativo prejuízo cognitivo espacial no teste de labirinto aquático de Morris em roedores submetidos à BDL. Contudo, o tratamento i.p com curcumina na dose de 40 mg/kg durante 4 semanas foi capaz de evitar o aumento da latência induzida pela BDL, sugerindo a melhora da aprendizagem espacial nesses animais. Corroborando esse estudo, Wang *et al.* (2014) demonstraram, em camundongos transgênicos duplos (APP^{swe}/PS1^{De9}) para DA, os efeitos neuroprotetores da curcumina na prevenção da perda da capacidade cognitiva espacial no teste de labirinto aquático de Morris. Nesse estudo, foi indicado que o tratamento crônico com curcumina, nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg (v.o), foi capaz de reduzir a latência nos 5 dias de treino, sugerindo uma melhora do déficit cognitivo espacial induzido pela DA.

Cho *et al.* (2020) observaram uma acentuada perda da memória espacial no teste de labirinto aquático de Morris em ratos machos submetidos ao modelo de diabetes tipo 2 espontâneo. Porém, ao serem exercitados e alimentados com uma dieta de ração suplementada com curcumina (5 g/kg) durante 5 semanas, notou-se a redução da latência e um aumento da retenção da memória espacial em comparação ao grupo controle. Similarmente, os dados de Metha *et al.* (2019) apontam que camundongos suíços albinos expostos ao arsênio apresentaram um nível elevado de déficit cognitivo espacial no teste de labirinto aquático de Morris, evidenciado pelo aumento da latência na fase de treino e uma redução significativa do tempo gasto no quadrante alvo no dia do teste, quando comparados ao grupo controle. Todavia, o tratamento crônico (45 dias) com curcumina na dose de 100 mg/kg por gavagem foi capaz de reverter os parâmetros comportamentais mencionados em animais do grupo arsênio+curcumina quando comparado ao grupo controle.

O trabalho de Mehmet *et al.* (2015) foi desenhado para investigar, em ratos *Wistar*, o papel da curcumina no comprometimento cognitivo espacial induzido pela cisplatina. Os animais, que foram submetidos ao pré-tratamento i.p com cisplatina (5 mg/kg) e ao tratamento por gavagem com curcumina (300 mg/kg) durante 5 semanas, apresentaram uma redução acentuada da latência durante os 3 dias da etapa de treinos, um aumento do número de entradas no quadrante alvo e um maior tempo de permanência no mesmo no teste de labirinto aquático de Morris, o que indica a melhora dos déficits cognitivos espaciais, quando comparados ao grupo cisplatina+veículo.

Reforçando os achados anteriores, Sharma *et al.* (2018) demonstraram que o uso a longo prazo de curcumina na dose de 30 mg/kg foi capaz de atenuar significativamente a latência durante a etapa de treinos e aumentar o número de entradas no quadrante alvo e do tempo gasto no mesmo, no teste de labirinto aquático de Morris, bem como reduzir o tempo para localizar a recompensa com menor número de erros, no teste de labirinto clássico, em animais submetidos ao pré-tratamento com flúor. Esses resultados indicam o efeito protetor da curcumina contra os prejuízos cognitivos espaciais induzidos pelo flúor, o qual foi semelhante ao observado pelo tratamento com resveratrol (30 mg/kg, v.o).

Adicionalmente, o trabalho de Khan *et al.* (2019) evidenciou, em ratos *Sprague-Dawley* submetidos à indução da sepse por LPS (250 µg/kg, i.p) por 7 dias e ao tratamento com curcumina (300 mg/kg, i.p) por 14 dias, a melhora acentuada da memória espacial, indicada pela redução significativa do tempo de latência e aumento expressivo dos parâmetros número de travessias para o quadrante alvo e tempo gasto no quadrante alvo no

teste de labirinto aquático de Morris, além do aumento da porcentagem de alteração nas tarefas no teste de labirinto em Y, quando comparados ao grupo controle.

Conforme demonstrado nesses trabalhos, é claro o papel da curcumina na recuperação dos prejuízos cognitivos espaciais em diferentes modelos experimentais e o nosso estudo reafirma esses dados. Vale ressaltar que ambos os comprometimentos cognitivos (de discriminação de novos objetos e espacial) foram atenuados pelo tratamento com curcumina 10 dias após a indução da sepse por CLP.

Existem várias hipóteses que elucidam a melhora da função cognitiva após o uso da curcumina. As ações antioxidante, anti-inflamatória e antiapoptótica são uma delas, pois modulam processos bioquímicos debilitantes envolvidos no prejuízo cognitivo como: a morte de neurônios induzida pelo estresse oxidativo, inflamação e disfunção mitocondrial (os quais também ocorrem durante a sepse) (HE *et al.*, 2015; TSAI *et al.*, 2021).

Embora não tenhamos obtido diferença estatística entre os grupos testados no teste de ANOVA, observamos por meio do tamanho do efeito o potencial antioxidante da curcumina pela primeira vez em um modelo de sepse induzida por CLP. Notamos em animais CLP+veículo um aumento significativo de nitrosilação proteica (produção de NO), NADPH (produção de ROS) e de TBARS (dano oxidativo) e uma redução da capacidade antioxidativa total (Trap) e dos níveis de GSH livre e total, em relação ao grupo Sham+veículo. Porém, ao receberem o tratamento com curcumina, os animais CLP apresentaram uma reversão significativa dos parâmetros mencionados, sugerindo a melhora do estresse oxidativo induzido pela sepse.

Sabe-se que a quantidade de ON e ROS produzidos ajudam na defesa contra patógenos invasores, portanto, é crítica para a resposta inflamatória e para o sistema imune inato. Por outro lado, concentrações inadequadamente altas podem culminar em efeitos tóxicos e deletérios em uma variedade de doenças humanas como a sepse, por exemplo. As atividades dessas moléculas oxidantes são altamente dependentes da concentração e, por isso, a regulação da produção é essencial para manter as funções fisiológicas adequadas e para controlar os seus efeitos deletérios (ABRAHAMS *et al.*, 2019; CINELLI *et al.*, 2020; LEO; CAMPOS, 2019).

Estudos *in vitro* relataram que a curcumina protege o cérebro da peroxidação lipídica e previne o dano oxidativo do DNA pela regulação de radicais hidroxila (HO), ON e ROS. Esse composto também foi descrito como um potente ativador da enzima glutathione S-transferase e, conseqüentemente, um indutor efetivo do aumento do conteúdo de GSH em

células cerebrais (BANERJEE, 2016; GONZÁLEZ-REYES *et al.*, 2008; ISHRAT *et al.*, 2009; MAZZANTI; GIACOMO, 2016; NISHINAKA *et al.*, 2007).

Lin *et al.* (2001) demonstraram em ratos a capacidade da curcumina de reduzir os níveis cerebrais de proteínas oxidadas contendo grupos carbonila. Belviranli *et al.* (2013) também evidenciaram uma ação antioxidante pela diminuição significativa dos níveis do fator oxidativo malondialdeído (MDA) no tecido cerebral após a suplementação com curcumina. Corroborando os achados anteriores, Banji *et al.* (2014) mostraram em roedores que o tratamento com curcumina reduziu efetivamente os níveis de caspase-3 clivada e enzimas mitocondriais na região CA1 do hipocampo, protegendo o cérebro contra os danos oxidativos.

Monroy *et al.* (2013) demonstraram que o tratamento com curcumina reprime a transcrição do gene de resposta de crescimento precoce 1 (Egr-1), que medeia TNF- α , IL-1 β , IL-8, MIP-1 β e MCP-1 por meio da interação com A β em ratos. Hamaguchi *et al.* (2010) observaram, no cérebro de camundongos transgênicos (Tg2576) para DA, que o tratamento com curcumina foi capaz de reduzir significativamente os níveis de proteínas oxidadas, de IL-1 β e de A β . Begum *et al.* (2008) também observaram uma menor oxidação de proteínas em camundongos transgênicos (Tg2576) tratados com curcumina e sugeriram que a ponte dienona, presente na estrutura química da curcumina, é necessária para isso.

As atividades antioxidante e anti-inflamatória da curcumina também foram evidenciadas em modelos de sepse induzida por CLP. Savcun *et al.* (2013) investigaram os efeitos antioxidantes e antiinflamatórios da curcumina durante a sepse induzida por CLP em ratos *Wistar*. Nesse estudo, os ratos sépticos foram submetidos à administração i.p de curcumina na dose de 200 mg/kg logo após a perfuração cecal e 12 horas após a cirurgia. O tratamento agudo com curcumina foi capaz de reduzir significativamente os níveis séricos de TNF- α e IL-1 β , bem como o de mieloperoxidase (MPO) tecidual (enzima responsável por produzir ROS), quando comparado ao tratamento com veículo. Os achados de Yang *et al.* (2013) corroboram o estudo anterior, uma vez que a administração de 200 mg/kg de curcumina durante 3 dias reduziu acentuadamente o fator oxidativo, a inflamação e o dano estrutural das células miocárdicas, bem como aumentou os níveis de SOD durante a sepse induzida por CLP.

O estudo conduzido por Xião *et al.* (2012) investigou os efeitos da curcumina em ratos submetidos ao CLP e posteriormente ao tratamento i.p com curcumina nas doses de 50 ou 200 mg/kg, 6, 12 e 24 horas após a indução da sepse. Os autores relataram que o

tratamento com curcumina em ambas as doses foi capaz de atenuar significativamente o aumento das atividades de MPO e MDA e a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidos pela sepse no tecido pulmonar. Além disso, a curcumina também foi capaz de diminuir o número de células inflamatórias no sangue e no líquido do lavado broncoalveolar.

Liu *et al.* (2017) elucidaram em ratos o papel fitoterápico da curcumina durante a sepse induzida por CLP. Os ratos CLP, tratados por gavagem com curcumina nas doses de 100 ou 200 mg/kg durante 45 dias, apresentaram um aumento do nível de SOD e uma redução das atividades de MPO e MDA e dos níveis de expressão de IL-1 β , TNF- α e do fator inibidor de macrófagos nos tecidos pulmonares, quando comparados ao grupo CLP+veículo. O trabalho de Aktas e Yildiran (2013) corrobora o estudo anterior, uma vez que demonstra o efeito antioxidante do pré-tratamento oral com curcumina (100 mg/kg) sobre o estresse oxidativo em ratos com lesão pulmonar induzida pela sepse. Os dados mostram que a curcumina foi capaz de prevenir o aumento da atividade de MDA, MPO e NO e a redução dos níveis de CAT e SOD induzidos por CLP.

A curcumina contém altos níveis de compostos antioxidantes, incluindo ligações de duplo carbono, anéis fenil e grupo β -diceto. Estudos adicionais em ratos mostraram que a propriedade lipossolúvel desse composto possibilita a proteção da membrana celular, uma vez que a curcumina é capaz de neutralizar HO, ON, ROS e peróxido de hidrogênio e induzir o aumento da atividade de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, quinona redutase induzida e glutathione S-transferase (KARIMI *et al.*, 2019; NIMSE; PAL, 2015; PARK *et al.*, 2020).

Outro importante marco patológico nos distúrbios neurodegenerativos é representado pela inflamação cerebral. Mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas liberadas por células ativadas (microglia, astrócitos, macrófagos e linfócitos), contribuem para o aumento do estresse oxidativo e conseqüentemente para o dano neuronal durante a sepse. Estudos relatam que a curcumina regula as respostas inflamatórias suprimindo a atividade dos fatores de transcrição como NF κ B e AP-1. Além disso, a curcumina bloqueia a indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e inibe a lipoxigenase e a ciclooxigenase-2 (COX-2) (BENGMARK *et al.*, 2006; HE *et al.*, 2015; MAZZANTI; GIACOMO, 2016; NANJI *et al.*, 2003; SANDUR *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* e *in vivo* também mostraram que a curcumina é capaz de impedir a síntese e a liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12. Boozari *et al.* (2019) elucidaram o papel anti-inflamatório deste composto, evidenciando o

seu efeito modulador sobre o receptor TLR4. Sabe-se que a ativação deste receptor culmina em uma série de eventos de sinalização intracelular, os quais induzem a ativação de NF- κ B com conseqüente produção de citocinas pró-inflamatórias, ROS e ON.

O estudo de Gradisar *et al.* (2007) mostrou que a curcumina se liga com afinidade à Proteína de Diferenciação Mielóide 2 (MD2), que é o componente de ligação ao LPS do complexo MD-2/TRL4. Corroborando esse trabalho, Zang *et al.* (2018) relataram a competição de um análogo de curcumina com o LPS para a ligação ao complexo MD2/TRL4, sugerindo que esse composto poderia ter uma ação inibitória de MD2. Young *et al.* (2006) demonstraram ainda que, durante a sinalização do TRL4 induzida por LPS, a curcumina foi capaz de exercer efeitos inibitórios através de vias dependentes das proteínas MyD88 e TRIF, bloqueando os processos inflamatórios e oxidantes.

A curcumina possui também a capacidade de inibir outros mediadores inflamatórios, como a proteína quimiotática de macrófagos-1 (MCP-1), o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), a proteína inflamatória macrofágica-2 (MIP-2), a quinase associada ao receptor IL-1 (IRAK1) e a expressão de NF- κ B, evidenciando-nos seu efeito na expressão das citocinas associadas à via de sinalização do TRL4 (KATO *et al.*, 2014; PENG *et al.*, 2010).

A inflamação e o estresse oxidativo também exercem um papel importante no desenvolvimento da disfunção da BHE, bem como na morte de neurônios. A literatura tem proposto que a curcumina protege a BHE e os neurônios contra os danos causados pela sepse devido à sua capacidade de atingir concentrações cerebrais suficientes para ativar eventos de transdução de sinais e reduzir fatores deletérios ao cérebro (ANGELOVA; ANDREY; ABRAMOV, 2020; SCAPAGNINI *et al.*, 2011).

Zhao *et al.* (2016) mostraram, em camundongos submetidos a sepse induzida por CLP, um intenso edema cerebral e aumento da expressão de Bax, bem como uma redução significativa da atividade mitocondrial e das expressões de Bcl2 e MMP. Em conjunto, esses dados indicam a perda da integridade da BHE, acompanhada de disfunção mitocondrial e apoptose celular em animais sépticos. Contudo, o tratamento por gavagem com curcumina na dose de 100 mg/kg durante 7 dias reduziu significativamente o edema cerebral em animais CLP. Além disso, os animais CLP+curcumina apresentaram uma atenuação da apoptose neuronal induzida pela sepse, evidenciada pela diminuição da expressão de Bax e do número de neurônios *dUTP nick-end labeling* (TUNEL) positivos e pelo aumento das expressões de MMP e Bcl2, quando comparados ao grupo CLP+veículo.

Similarmente, Vachharajani *et al.* (2010) mostraram, em camundongos pré-tratados com curcumina (100 mg/kg, i.p) durante 48 ou 72 horas e posteriormente submetidos a indução da sepse por CLP, a redução da disfunção da BHE e da adesão leucocitária e plaquetária induzidas pela sepse, via modulação da expressão da P-selectina (proteína responsável pela adesão de leucócitos no endotélio vascular e da cascata precoce de eventos que culminam em processos inflamatórios).

Em um modelo de lesão medular espinhal, Li *et al.* (2021) observaram, em ratos *Sprague Dawley* tratados com injeção intramuscular percutânea de curcumina na dose de 60 mg/kg por 3 semanas, a melhora da integridade da medula espinhal, remielinização e supressão da resposta inflamatória e da apoptose neuronal. Zhou *et al.* (2020) notaram um resultado semelhante ao estudo anterior, no qual os neurônios de ratas *Sprague Dawley* submetidas à hipóxia apresentaram uma menor neurodegeneração e níveis de expressão de caspase-3, TNF- α e IL-6 após o tratamento com curcumina em diferentes doses.

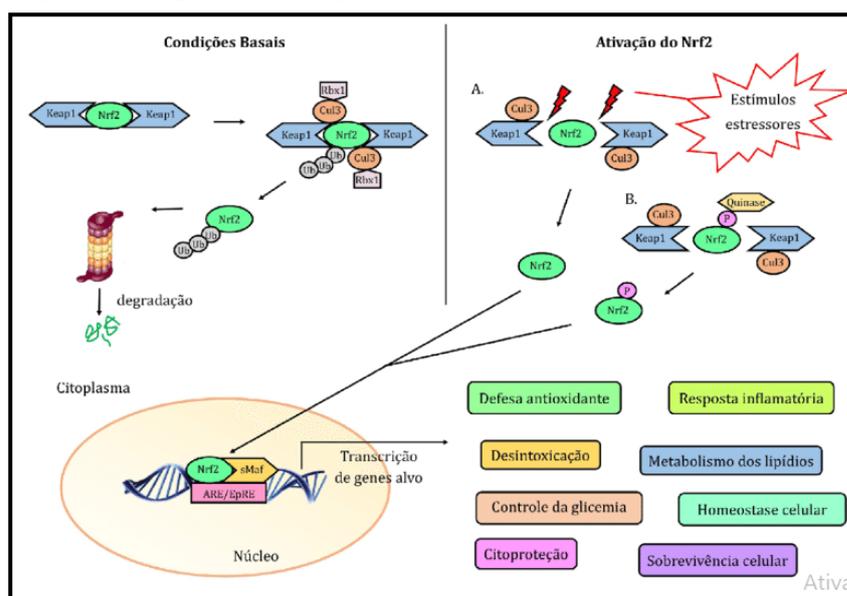
Já Kuo *et al.* (2011) notaram uma melhora significativa dos níveis de glutamato e da preservação do seu transportador em ratos submetidos à hemorragia subaracnóidea (HAS) e posteriormente ao tratamento i.p com curcumina 20 mg/kg durante 6 dias. Além disso, foi observado em animais do grupo HAS+curcumina o aumento das atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase, bem como a uma redução significativa de MDA e dos escores de degeneração neuronal e neurológicos, quando comparados ao grupo controle. O trabalho de Huang *et al.* (2018) reafirma esses dados, pois evidenciou a atenuação de parâmetros neurodegenerativos e apoptóticos em ratos submetidos à lesão axonal difusa e posteriormente ao tratamento intraperitoneal com curcumina na mesma dose. Os autores sugeriram que a propriedade antiapoptótica da curcumina poderia estar relacionada à sua capacidade em modular a via do fator 2 relacionado ao fator eritróide 2 (Nrf2).

O Nrf2 é reconhecido como o principal fator responsivo ao estresse que melhora os efeitos adversos de diferentes agentes estressores, tais como: inflamação, estresse oxidativo, xenobióticos, proteínas mal dobradas e metabólitos excessivos. Em condições basais, esse fator de transcrição encontra-se associado a duas moléculas de proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (Keap1), conhecida como repressor natural do Nrf2, uma vez que o mantém no citoplasma celular. A Keap1 atua como intermediário para a ligação do complexo curcumina ubiquitina ligase E3 e proteína caixa de anel 1 (Cul3:Rbx1), o qual é responsável por marcar o Nrf2 para ubiquitinação e degradação via proteassoma 26S. Dessa forma, em condições fisiológicas, a Keap1 modula a concentração de Nrf2 no citoplasma celular

(JIANG *et al.*, 2020; KARIMI *et al.*, 2019; VASCONCELOS *et al.*, 2019; TABRIZI *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2017).

No entanto, quando a célula é exposta a estímulos estressores, como durante a sepse, alguns resíduos reativos de cisteína em Keap1 são oxidados. Esse evento, por sua vez, altera a conformação da Keap1 e induz a liberação e ativação do Nrf2 no citoplasma celular. O Nrf2 também pode ser ativado por meio da ação direta de proteínas quinases tais como proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK), Jun N-terminal quinase (JNK), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e proteína quinase C (PKC), as quais atuam fosforilando o Nrf2 em resíduos de serina ou treonina, facilitando a sua dissociação da Keap1 e posterior ativação e translocação nuclear (Figura 27) (HASSAN *et al.*, 2019; HAHN; OLIVEIRA; BOCK, 2017).

Figura 27 – Representação esquemática da sinalização de Nrf2



Fonte: HAHN; OLIVEIRA; BOCK, 2017.

Nota: Em condições basais, o Nrf2 permanece no citoplasma associado a duas moléculas de Keap1. A associação Keap1 permite a ligação do complexo Cul3:Rbx1, que marca o Nrf2 para degradação via proteassoma. Em resposta a estímulos estressores, a Keap1 sofre ação oxidante de cisteínas reativas e/ou Nrf2 sofre fosforilação direta pela ação de proteínas quinases, permitindo a sua liberação no citoplasma e posterior translocação para o núcleo celular. Uma vez presente no núcleo, ativa genes envolvidos na resposta anti-inflamatória, antioxidante, citoproteção e senescência celular.

Como mostrado na figura 27, as moléculas de Nrf2 presentes no núcleo celular associam-se à heterodímeros de proteína fibrossarcoma musculoaponeurótico pequeno (sMaf), formando complexos Nrf2:sMaf. Esses complexos, por sua vez, se ligam aos elementos de resposta antioxidante (ARE) e/ou de resposta eletrofílica (EpRE) na região promotora dos genes alvo e iniciam o processo de transcrição de diferentes proteínas, enzimas antioxidantes e enzimas da fase II de detoxificação do metabolismo. Dessa forma, o Nrf2 consegue induzir respostas de proteção e aumento da sobrevivência celular frente a diferentes estímulos estressores (HAHN; OLIVEIRA; BOCK, 2017).

Evidências recentes mostram que o efeito neuroprotetor da curcumina também pode estar relacionado à sua capacidade de regular a resposta imune à infecção visando a modulação da atividade de Nrf2, a qual é conduzida para inibir a inflamação e o estresse oxidativo. O efeito da curcumina mostrou-se eficaz na ativação do sistema de desintoxicação da fase II por meio da modulação de Nrf2/ARE, melhorando a resposta oxidativa em animais sépticos (ANGELOVA; ANDREY; ABRAMOV, 2021; FARD *et al.*, 2022; GRILC; SOVA; KRISTL, 2021; HASSAN *et al.*, 2019; SCAPAGNINI *et al.*, 2011).

Xie *et al.* (2014) mostraram em ratos submetidos à lesão cerebral traumática e posteriormente ao tratamento por gavagem com curcumina (200 mg/kg), a melhora evidente do estresse oxidativo, apoptose neuronal, volume de água no cérebro e da pontuação de gravidade neurológica. Segundo os autores, os efeitos antiapoptóticos ocorreram pela capacidade desse composto de aumentar a expressão de Bcl-2 e reduzir significativamente a atividade da caspase-3 clivada. Além disso, foi evidenciado um aumento da translocação nuclear de Nrf2 induzido pela curcumina, o que foi capaz de aumentar a expressão de genes responsáveis por impedir a redução da atividade anti-inflamatória e antioxidante. Esse efeito induziu um aumento expressivo da atividade de enzimas antioxidantes e a diminuição da lesão cerebral, sugerindo que a ativação do eixo Nrf2/ARE induzida pela curcumina pode ser eficaz contra a morte neuronal em ratos com lesão cerebral traumática.

Dong *et al.* (2018) evidenciaram que a administração por gavagem de curcumina (50 mg/kg) pode reduzir a lesão do córtex ipsilateral, a infiltração de neutrófilos e a ativação da micróglia em ratos com lesão cerebral traumática. Os efeitos desempenhados por esse composto levaram ao aumento da sobrevivência dos neurônios, bem como à redução da apoptose associada ao trauma. Descobriu-se nesse trabalho que o Nrf2 foi o principal mediador desses efeitos, uma vez que a deleção desse fator de transcrição reduziu o impacto neuroprotetor da curcumina.

Wu *et al.* (2013) exibiram um rápido aumento da expressão intracelular de NadpH e quinona oxidoredutase 1 (NQO1), bem como uma redução da fosforilação de Akt e expressão de Nrf2 em neurônios de ratos submetidos à lesão cerebral isquêmica. Entretanto, ao tratar as células com diferentes concentrações de curcumina (2,5, 5,0, 10 ou 25 μ M), observou-se uma clara atenuação dos danos oxidativos induzidos pela isquemia cerebral, indicada pelo aumento da expressão de NQO1 e da atividade de ligação de Nrf2 ao ARE.

Reforçando o estudo anterior, Dai *et al.* (2018) mostraram, em ratos submetidos ao tratamento com curcumina (100 mg/kg, i.p), uma melhora significativa da lesão cerebral secundária induzida por trauma encefálico apontada pela redução do conteúdo de água cerebral. Além disso, o tratamento com curcumina diminuiu significativamente o nível de caspase-3 clivada e aumentou a atividade de enzimas antioxidantes e a expressão de Bcl-2, heme-oxigenase 1 (HO-1), NQO1 e Nrf2.

Li *et al.* (2016) também relataram o efeito neuroprotetor da curcumina. Nesse estudo, observou-se uma redução significativa do edema cerebral, da ruptura da BHE, do estresse oxidativo e da expressão de NFkB e a regulação positiva de Nrf2 em ratos *Wistar* submetidos ao tratamento i.p com curcumina na dose de 300mg/Kg 30 minutos após a oclusão da artéria média cerebral, quando comparados ao grupo isquemia+veículo. Esses dados sugerem que os efeitos protetores da curcumina contra a lesão cerebral refletem atividades antioxidante, anti-inflamatória e antiapoptótica, as quais culminam na elevação de Nrf2 e regulação negativa de NFkB.

O trabalho desenvolvido por Daverey e Agrawal (2018) destinou examinar em astrócitos o efeito antioxidante comparativo dos tratamentos com curcumina e resveratrol. Após a exposição dos astrócitos ao peróxido de hidrogênio por 4 ou 24h, notou-se que ambos os compostos aumentaram significativamente a sobrevivência celular. Além disso, foi observado que o resveratrol foi capaz de inibir acentuadamente a produção de ROS em ambos os momentos, enquanto a curcumina mostrou-se eficaz apenas em 4h, sugerindo que a curcumina é mais ativa na inibição de ROS na fase inicial do insulto oxidativo. Ao comparar a expressão de NFkB, o tratamento com curcumina mostrou melhor ação anti-inflamatória, enquanto o tratamento com resveratrol não obteve nenhum efeito.

Curiosamente, a curcumina mostrou uma regulação positiva na expressão nuclear de Nrf2 em 24h, já o resveratrol não apresentou efeito após esse tempo de incubação. Com base nessas observações, é possível inferir que o tratamento com curcumina é mais eficaz nas primeiras horas após a indução do estresse oxidativo, à medida que o resveratrol é eficaz

apenas nas últimas horas, sugerindo que o resveratrol pode ou não ter efeito imediato nos astrócitos.

Sabe-se que o astrócito é o tipo de célula mais comum do SNC e que desempenha um papel crucial nas principais patologias que ocorrem morte celular. Estudos mostraram que níveis aumentados de GSH em astrócitos também pode ser um componente importante da proteção observada pela ativação de Nrf2 mediada pela curcumina. A GSH é sintetizada pela ação consecutiva das enzimas glutamato-cisteína ligase e glutathione sintetase. As subunidades catalíticas glutamato-cisteína ligase (GCLC) e modificadora (GCLM) compõem o complexo enzimático limitante de velocidade para a síntese de GSH. Interessantemente, GCLC e GCLM são aumentadas pela ativação de Nrf2. Alguns autores evidenciaram que a ativação de Nrf2 em astrócitos leva à síntese de GSH mais eficiente, elevando mais o seu conteúdo nessa célula do que em neurônios (CHOI *et al.*, 2014; DAI *et al.*, 2018)

O aumento da síntese e secreção de GSH pelo astrócito é conhecido por melhorar o status antioxidante de neurônios co-cultivados e conseqüentemente protegê-los. Alguns estudos mostraram que a GSH secretada pode defender os neurônios atuando como antioxidante no compartimento extracelular e/ou aumentando a disponibilidade de precursores para a síntese de GSH e o seu nível neuronal, atenuando conseqüentemente a morte neuronal (OKSANEN *et al.*, 2020).

A morte de neurônios colinérgicos e o aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) (responsável por degradar a acetilcolina (ACh) na fenda sináptica) também contribuem para o desenvolvimento dos déficits cognitivos e de memória durante a sepse. Sabe-se que a ACh, em conjunto com outros neurotransmissores, é capaz de alterar o equilíbrio das contribuições de diferentes sistemas neuronais, favorecendo a aprendizagem e a formação da memória. Uma forte predição dessa hipótese é que a liberação de ACh no hipocampo permite ao rato identificar a estratégia cognitiva a ser utilizada (para vantagem ou desvantagem), quando confrontado com diferentes situações de aprendizagem (HAAM; YAKEL, 2017; HASSELMO, 2006; ZUJALOVIC *et al.*, 2020).

Alguns estudos que abordaram as atividades biológicas da curcumina demonstraram que esse composto também possui uma ação anticolinesterásica, melhorando a memória de ratos. Akinyemi (2017) buscou avaliar em ratos o efeito do tratamento por gavagem com curcumina (12,5 ou 25 mg/kg) na atividade da AChE e no comprometimento da memória induzido pelo pré-tratamento com cádmio. Os resultados desse estudo revelaram uma

redução significativa da tarefa de reconhecimento de novos objetos (no teste de reconhecimento de objetos), bem como um aumento da atividade cerebral da AChE e do estresse oxidativo em ratos tratados com cádmio. Contudo, ao tratar os animais com curcumina, observou-se a melhora da memória de reconhecimento e a atenuação da degradação da ACh e do estresse oxidativo induzidos pelo cádmio.

Corroborando o estudo anterior, da Costa (2017) mostrou, em ratos expostos aos tratamentos crônicos com cádmio e curcumina (30, 60 ou 90 mg/kg, p.o), uma redução do tempo de latência no teste de esquiwa inibitória e da atividade da AChE em diferentes regiões cerebrais, sugerindo um possível mecanismo de ação para suas propriedades de aprimoramento cognitivo em condições tóxicas para o SNC.

Já o trabalho de Oz (2015) foi desenhado para investigar o papel do tratamento com curcumina (300 mg/kg) sobre o comprometimento cognitivo induzido pela cisplatina em ratos *Wistar*. Os resultados mostraram que o tratamento com curcumina foi capaz de melhorar o tempo de latência na etapa de treino, bem como o tempo de permanência no quadrante alvo (no dia do teste) no teste de labirinto aquático de Morris, em relação ao grupo controle. Além disso, foi observada uma queda substancial da atividade da AChE e dos níveis de MDA e SOD no hipocampo de animais cisplatina+curcumina. Em conjunto, esses achados indicam que o tratamento com curcumina foi capaz de melhorar o comprometimento da memória espacial e o estado oxidativo induzidos pela cisplatina.

Wu (2017) evidenciou, em camundongos machos submetidos à cirurgia de ligação e perfuração cecal e posteriormente ao tratamento crônico por gavagem com curcumina nas doses de (50, 100 ou 200 mg/kg), a melhora dose-dependente das memórias de reconhecimento e espacial (nos testes de reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris, respectivamente) e da atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT com uma consequente redução da atividade da AChE, quando comparado ao grupo controle.

O estudo molecular desenvolvido por Tello-Franco (2013) sugeriu que a ação anticolinesterásica desempenhada pela curcumina pode estar relacionada à presença dos dois anéis aromáticos e pela distância entre eles na sua molécula estrutural. Fatores esses que permitem que esse composto e seus derivados interajam favoravelmente por meio da formação de ligações de hidrogênio com os sítios quaternários e acil presentes periféricamente na estrutura da AChE. Por sua vez, essa interação leva à redução da atividade da AChE e ao consequente aumento dos níveis ACh na fenda sináptica. O aumento da disponibilidade de ACh favorece consideravelmente a interação com os receptores

colinérgicos pós-sinápticos, culminando no melhor desempenho do indivíduo durante os processos cognitivos.

Outro mecanismo envolvido na recuperação dos processos cognitivos e de memória, que merece ser destacado, é o de neuroplasticidade. A neuroplasticidade é definida como a capacidade do cérebro de mudar ou adaptar-se às alterações fisiológicas ou patológicas resultantes da interação com o ambiente. O BDNF é considerado um mediador instrutivo da plasticidade funcional e estrutural do SNC, uma vez que é uma das neurotrofinas mais distribuídas e amplamente estudadas no cérebro (COLUCCI-D'AMATO; SPERANZA; VOLPICELLI, 2020).

Sabe-se que a redução do nível de BDNF no cérebro é capaz de afetar consideravelmente a aprendizagem e a memória. Nesse sentido, estudos envolvendo o efeito da curcumina sobre a memória e cognição têm demonstrado que esse composto é capaz de modular a liberação de BDNF no cérebro e recuperar as funções neurocognitivas. Nam (2014) mostrou uma redução do tempo de latência no teste de labirinto aquático de Morris em camundongos submetidos ao modelo de envelhecimento induzido por D-galactose e posteriormente ao tratamento crônico com curcumina (100 mg/kg, p.o). A melhora da aprendizagem espacial foi acompanhada pela redução da proliferação celular e pelo aumento dos níveis de CREB fosforilado e BDNF hipocampais.

Zhang (2015) mostrou o impacto positivo do tratamento intraperitoneal com curcumina (50, 100 ou 200 mg/kg) sobre a memória espacial e os níveis de BDNF de ratos que receberam A β intraventricularmente. O tratamento com curcumina foi capaz de reverter de forma dose-dependente os déficits cognitivos induzidos por A β , bem como aumentar os níveis de BDNF e ERK fosforilado no hipocampo.

Já o estudo desenvolvido por Liu (2014) objetivou determinar se a administração de curcumina (10 mg/kg, p.o) influencia os déficits cognitivos induzidos pelo estresse imprevisível crônico. Os dados obtidos a partir do teste de labirinto aquático de Morris mostram que esse composto reduziu o tempo de latência (durante a etapa de treinos) e aumentou o tempo de permanência no quadrante alvo (no dia do teste) em animais estressados. Além disso, foi observado nesses animais um aumento significativo da expressão de BDNF e ERK fosforilado no hipocampo, sugerindo que os efeitos cognitivos da curcumina em ratos estressados podem estar relacionados à sua aptidão em promover a via BDNF/ERK hipocampal.

Conforme demonstrado nesses estudos, são claros os efeitos pleiotrópicos da curcumina para a recuperação das tarefas cognitivas. Frente a essas informações, sugerimos que o tratamento com curcumina na dose de 50 mg/kg é capaz de atenuar os déficits cognitivos e o estresse oxidativo induzidos pela sepse, possivelmente pela sua capacidade de modular as respostas inflamatórias e oxidantes através da ativação das vias NFkB e Nrf2. Sugerimos, ainda, que esse composto também recupera as funções cognitivas prejudicadas pela sepse por meio da redução da atividade da AChE e promoção da neuroplasticidade pela ativação da via BDNF/ERK.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permite-nos inferir que a sepse induzida por ligação e perfuração cecal induz prejuízos nas de memórias de reconhecimento (em 2 e 24 horas) e espacial 10 dias após o CLP, os quais permaneceram de forma tempo-dependente à essa condição clínica.

Os dados deste estudo também demonstram que o tratamento oral com curcumina, na dose de 50 mg/kg durante sete dias consecutivos, diminuiu os déficits cognitivos observados nas tarefas de reconhecimento de objetos (em 2 e 24 horas) e espacial 10 dias após a indução da sepse.

Além disso, o tratamento com curcumina foi capaz de modular a resposta oxidante induzida pela inflamação sistêmica, observado pela redução dos níveis de nitrosilação proteica, NADPH, TBARS e Trap, e aumento dos níveis de GSH livre e total. Sendo assim, evidenciamos que a curcumina reverte os déficits cognitivos e de memória causados pelo CLP por meio da sua ação antioxidante.

REFERÊNCIAS

- AACHOIUI, Y. *et al.* Caspase-11 protects against bacteria that escape the vacuole. **Science**, v. 339, p. 975–978, 2013.
- ABRAHAMS, S. *et al.* Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative and nitrosative stress: A review. **Neuroscience**, v. 406, p. 1–21, 2019.
- ADAM, N. *et al.* Sepsis-induced brain dysfunction. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 2, p. 211-221, 2013.
- AGGARWAL, B. B. *et al.* Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Res**, v. 23, n. 1, p. 363-398, 2003.
- AKINYEMI, A. J. *et al.* Curcumin improves episodic memory in cadmium induced memory impairment through inhibition of acetylcholinesterase and adenosine deaminase activities in a rat model. **Metab Brain Dis**, v. 32, p. 87-95, 2017.
- AKINYEMI, A. J. *et al.* Curcumin administration suppress acetylcholinesterase gene expression in cadmium treated rats. **Neurotoxicology**, v. 62, p. 75-79, 2018.
- AKTAS, E; YILDIRAN, H. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of curcumin on lung tissue in rats with sepsis. **J Tradit Chin Med**, v. 40, n. 5, p. 820-826, 2013.
- ALEXANDRE, P. C. B. **Disfunção cerebral associada à sepse e papel das estatinas na prevenção do dano cognitivo em modelo de sepse experimental**. 94 f. 2014. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Departamento de Biologia Celular e Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.
- ANDONEGUI, G. *et al.* Targeting inflammatory monocytes in sepsis-associated encephalopathy and long-term cognitive impairment. **JCI Insight**, v. 3, n. 9, 2018.
- ANGELOVA, P. R; ANDREY, N. E; ABRAMOV, A. Y. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. **Med Res Rev**, v. 41, p. 770–784, 2021.
- ANGUS, D. C; POLL, T. V. D. Severe sepsis and Septic Shock. **The New England Journal of Medicine**, n. 369, p. 840-851, 2013.
- BAGHBADERANI, S. *et al.* Curcumin prevents cognitive deficits in the bile duct ligated rats. **Psychopharmacology**, v. 237, n. 12, p. 3529-3537, 2020.
- BANERJEE, B. *et al.* Benzo(a)pyrene Induced p53 Mediated Male Germ Cell Apoptosis: Synergistic Protective Effects of Curcumin and Resveratrol. **Front Pharmacol**, v. 7, p. 245, 2016.

BANJI, O. J F; BANJI, D; KALPHANA, C. Curcumin and hesperidin improve cognition by suppressing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by D-galactose in rat brain. **Food Chem Toxicol**, v. 74, p. 51-59, 2014.

BARICHELLO, T. *et al.* Long-term cognitive outcomes after sepsis: a translational systematic review. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 1, p. 186-251, 2019.

BASSANI, T. B. *et al.* Effects of curcumin on short-term spatial and recognition memory, adult neurogenesis and neuroinflammation in a streptozotocin-induced rat model of dementia of Alzheimer's type. **Brain Research Bulletin**, v. 335, p. 41-5, 2017.

BATINIC, B. *et al.* Lipopolysaccharide exposure during late embryogenesis results in diminished locomotor activity and amphetamine response in females and spatial cognition impairment in males in adult, but not adolescent rat offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 299, p. 72-80, 2016.

BEGUN, A. N. *et al.* Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 326, n. 1, p. 196, 2008.

BENGMARK, S. *et al.* Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NF- κ B, cyclooxygenase-2, lipoxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: A shield against acute and chronic diseases. **J Parenter Enter Nutr**, v. 20, p. 45-51, 2006.

BERDILI, N. *et al.* Sevoflurane exerts brain-protective effects against sepsis-associated encephalopathy and memory impairment through caspase 3/9 and Bax/Bcl signaling pathway in a rat model of sepsis. **Journal of International Medical Research**, v. 0, n. 0, p. 1-15, 2018.

BEKINSCHETEIN, P; CAMMAROTA, M; MEDINA, H, M. BDNF and memory processing. **Neuropharmacology**, p. 1-7, 2013.

BIFF, D. *et al.* Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. **Shock**, v. 40, n. 1, p. 45-48, 2013.

BLANCO, A. P; GARCÍA-SÁEZ, A. J. Bax, Bak and beyond: mitochondrial performance in apoptosis. **J. FEBS**, v. 2085, n. 3, p. 416-431, 2018.

BOOZARI. M; BUTLER. A. E; SAHEBKAR.A. Impact of curcumin on toll- like receptors. **J Cell Physiol**, p. 1-13, 2019.

BROZ, P; MONACK, D. M. Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. **Immunol Rev**, v. 243, p. 174-190, 2011.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, p. 854-865, 2005.

CASTILLO-DIAZ, F. *et al.* Activation of D1/5 Dopamine Receptors in the Dorsal Medial Prefrontal Cortex Promotes Incubated-Like Aversive Responses. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, p. 29, 2017.

CALLAGHAN, C. K; KELLY, A. M. Differential BDNF signaling in DG and perirhinal cortex during consolidation of recognition memory in the rat. **Hippocampus**, v. 22, p. 2127-2135, 2012.

CALSAVARA, A. C. *et al.* Late anxiety-like behavior and neuroinflammation in mice subjected to sublethal polymicrobial sepsis. **Neurotoxicity research**, v. 24, n. 2, p. 103-108, 2013.

CAVALCANTE, S. F. A. *et al.* Acetylcholinesterase: the “Hub” for neurodegenerative diseases and chemical weapons convention. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 414, 2020.

CHANDRA, V. *et al.* Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India: the Indo-US study. **Neurology**, v. 57, p. 985–989, 2001.

CHAUDHRY, N, DUGGAL, A. K. Sepsis associated encephalopathy. **Adv Med**, v. 2014. p. 1-16, 2014.

CHO, J. A. *et al.* Exercise and Curcumin in Combination Improves Cognitive Function and Attenuates ER Stress in Diabetic Rats. **Nutrients**, v. 12, p. 1309, 2020.

CHOI, B. H. *et al.* Effect of Redox Modulating NRF2 Activators on Chronic Kidney Disease. **Molecules**, v. 19, p. 12727-12759, 2014.

CINELLI J. R. *et al.* Object recognition memory: Distinct yet complementary roles of the mouse CA1 and perirhinal cortex. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 13, 2020.

COLE, G. M; TETER, B; FRAUTSCHY, S. A. Neuroprotective effects of curcumin. **Adv Exp Med Biol**, v. 595, p. 197–212, 2007.

COLUCCI-D'AMATO, L; SPERANZA, L; VOLPICELLI, F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 20, p. 7777, 2020.

COMIM, C. M. *et al.* Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. **Mitochondrion**, v. 8, p. 313–318, 2008.

COMIM, C. M. *et al.* Experimental Neonatal Sepsis Causes Long-Term Cognitive Impairment. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 9, p. 5928-5934, 2015.

CZEMPIK, P. F; PLUTA, M. P; KRZYCH, L. J. Sepsis-Associated Brain Dysfunction: A Review of Current Literature. **Int J Environ Res Public Health**, v. 17, n. 16, p. 5852, 2020.

- da COSTA, P. *et al.* Curcumin Attenuates Memory Deficits and the Impairment of Cholinergic and Purinergic Signaling in Rats Chronically Exposed to Cadmium. **Environ Toxicol**, v. 32, n. 1, p. 70-83, 2017.
- DAI, W. *et al.* Curcumin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE signaling pathway. **Brain Research Bulletin**, v. 140, p. 65-71, 2018.
- D' AMATO, L. C; SPERANZA, L; VOLPICELLI, F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. **Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 7777, 2020.
- DANIELSKI, L. G *et al.* Brain barrier breakdown as a cause and consequence of neuroinflammation in sepsis. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 1045-1053, 2018.
- DAL-PIZZOL, F; RITTER, C; CASSOL-JR, O. J. Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis. **Neurochem Res**, v. 35, p. 1– 12, 2010.
- DAL-PIZZOL, F; TOMASI, D; RITTER, C. Septic encephalopathy: does inflammation drive the brain crazy? **Rev Bras Psiquiatr**, v. 36. n. 3, p. 251-258, 2014.
- DAVEREY, A; AGRAWAL, S. K. Pre and post treatment with curcumin and resveratrol protects astrocytes after oxidative stress. **Brain Research**, v. 1692, p. 45-55, 2016.
- DELLINGER, R. P. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. **Intensive Care Medicine**, v. 39, n. 2, p. 165-228, 2013.
- DIEHL, F. **Plasticidade de receptores colinérgicos muscarínicos M4 hipocámpais decorrentes de uma consolidação da memória como possível marcador sináptico do engrama: ensaios farmacológico-comportamentais.** 131 f. 2010. Tese (Doutorado em Neurociências), Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- DOLATABADI, L. K. *et al.* Curcumin effects on memory impairment and restoration of irregular neuronal distribution in the hippocampal CA1 region after global cerebral ischemia in male rats. **Basic and Clinical Neuroscience**, v. 10, n. 5, p. 527-539, 2019.
- DONG, W. *et al.* Curcumin plays neuroprotective roles against traumatic brain injury partly via Nrf2 signaling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 346, p. 28-36, 2018.
- DUDAI, Y; KARNI, A; BORN, J. The consolidation and transformation of memory. **Neuron**, v. 88, n. 1, p. 20-32, 2015.
- EDLICH, f. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 500, n. 1, p. 26-34, 2017.
- EL-EZZ, D. A. *et al.* Trans-cinnamaldehyde modulates hippocampal Nrf2 factor and inhibits amyloid beta aggregation in LPS-induced neuroinflammation mouse model. **Neurochemical Research**, v. 43, p. 2333–234, 2018.

- FARD, S. G. *et al.* Nrf2-related therapeutic effects of Curcumin in different disorders. **Biomolecules**, v. 12, p. 82, 2022.
- FANG, J. *et al.* Epigenetic modulation of neuronal apoptosis and cognitive functions in sepsis-associated encephalopathy. **Neurological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 283-288, 2014.
- FLORES-MARTINEZ. M. Y. *et al.* Acute neuroinflammatory response in the substantia nigra pars compacta of rats after a local injection of Lipopolysaccharide. **Journal of Immunology Research**, p. 1-19, 2018.
- FRANKLAND, P. W; JOSSELYN, S. A. Starring role for astrocytes in memory. **Nature Neuroscience**, v. 23n n. 10, p. 1181-1182, 2020.
- FRICKER, M. *et al.* Neuronal cell death. **Physiological reviews**, v. 98, n. 2, p. 813-880, 2018.
- FURINI, C.R. *et al.* Beta-adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. **Hippocampus**, v. 20, p. 672-683, 2010.
- GALIC. A. M; RIAZI. K; PITTMAN. Q. J. Cytokines and brain excitability. **Front Neuroendocrinol**, v. 33, n. 1, p. 116-125, 2013.
- GASPAROTTO. J. *et al.* Receptor for advanced glycation end products mediates sepsis-triggered amyloid- β accumulation, Tau phosphorylation, and cognitive impairment. **Journal Biol Chem**, v. 293, n. 1, p. 226–244, 2017.
- GIACOBBO, B. L. *et al.* Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. **Molecular Neurobiology**, v. 56, p. 3295–3312, 2019.
- GIROFALO, A. M. *et al.* Histopathological changes of organ dysfunction in sepsis. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 7, n. 1, p. 2-15, 2019.
- GOLDIM, M. P. S. **Estudo do comportamento doentio na sepse experimental e o envolvimento da disfunção cerebral e ativação microglial**. 121 f. 2018. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Departamento de Ciências da Saude, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2018.
- GONZÁLEZ-REYES, S. *et al.* Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats. **Oxid Med Cell Longev**, 2013.
- GRADISAR, H. *et al.* MD-2 as the target of Curcumin in the inhibition of response to LPS. **J Leukoc Biol**, v. 82, n. 4, p. 968-974, 2007.
- GU, M. *et al.* Sepsis and Cerebral Dysfunction: BBB Damage, Neuroinflammation, Oxidative Stress, Apoptosis and Autophagy as Key Mediators and the Potential Therapeutic Approaches. **Neurotoxicity Research**, v. 39, p. 489–503, 2021.

GUTIERREZ, M. E. Z. *et al.* Co-nanoencapsulated meloxicam and curcumin improves cognitive impairment induced by amyloid-beta through modulation of cyclooxygenase-2 in mice. **Neural Regeneration Research**, v. 16, n. 4, p. 783-789, 2021.

HAAM, J; YAKEL, J. L. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. **J Neurochem**. p. 111–121, 2017.

HABA, R. *et al.* Lipopolysaccharide affects exploratory behaviors toward novel objects by impairing cognition and/or motivation in mice: Possible role of activation of the central amygdala. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 2, p. 423-31, 2012.

HABBAS, S. *et al.* Neuroinflammatory TNF α impairs memory via astrocyte signaling. **Cell**, v. 163, p. 1730–1741, 2015.

HAGAR, J. A. *et al.* Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. **Science**, v. 341, p. 1250–1253, 2013.

HAHN, G. F; OLIVEIRA, J. R; BOCK, P. M. The role of factor 2 eruthroid nuclear factor 2 (Nrf2) in diabetes mellitus. **Clin Biomed Res**, v. 37, n. 3, p. 203-213, 2017.

HASSAN, F. U. *et al.* Curcumin as an alternative epigenetic modulator: mechanism of action and potential effects. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 514, 2019.

HASSELMO, M. E. The role of acetylcholine in learning and memory. **Curr Opin Neurobiol**, v. 16, n. 6, p. 710-715, 2006.

HE, Y. *et al.* Curcumin, Inflammation, and Chronic Diseases: How Are They Linked?. **Molecules**, v. 20, p. 9183-9213, 2015.

HELDT, S. A. *et al.* Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. **Mol Psychiatry**, v. 12, p. 656-670, 2007.

HERNANDES, M. S. *et al.* The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2014.

HOOGLAND, I. C. M. *et al.* Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, p. 114-127, 2015.

HUANG, M. Gamma-secretase inhibitor DAPT prevents neuronal death and memory impairment in sepsis associated encephalopathy in septic rats. **Chin Med J**, v. 127, p. 924–928, 2014.

HUANG, T. *et al.* Curcumin mitigates axonal injury and neuronal cell apoptosis through the PERK/Nrf2 signaling pathway following diffuse axonal injury. **Neuroreport**, v. 29, n. 9, p. 661-677, 2018.

INCE, C. *et al.* The endothelium in sepsis. **Shock**, v. 45, n. 3, p. 259–270, 2016.

Instituto Latino Americano para Estudos da Sepse. Programa de melhoria de protocolos gerenciados de sepse – Relatório de atividades anuais. **ILAS**. p. 1-9, 2019.

ISHARAT, T. *et al.* Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 19, p. 636–647, 2009.

IZQUIERDO, V. *et al.* Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, p. 496-505, 2006.

JAQUES, J. A. S. *et al.* Free and nanoencapsulated curcumin prevents cigarette smoke-induced cognitive impairment and redox imbalance. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 100, p. 98–107, 2013.

JAYAPRAKASHA, G. K. *et al.* Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 13, p. 3668-3672, 2002.

JIANG, C. *et al.* Nrf2/ARE is a key pathway for curcumin-mediated protection of TMJ chondrocytes from oxidative stress and inflammation. **Cell Stress and Chaperones**, v. 25, n. 3, p. 395-406, 2020.

JONIDES, J. *et al.* The mind and brain of short-term memory. **Annu Rev Psychol**, v. 59, p. 193-224, 2008.

JORDÃO, V. N. *et al.* Sepse: uma discussão sobre as mudanças de seus critérios diagnósticos. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 2, p. 1294-1312, 2019.

KARIMI, A. *et al.* Therapeutic effects of curcumin on sepsis and mechanisms of action: A systematic review of preclinical studies. **Phytotherapy Research**, p. 1–23, 2019.

KATO, S. *et al.* Endotoxin-induced chemokine expression. In murine peritoneal mesothelial cells: The role of toll-like receptor 4. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 5, p. 1289-1299, 2014.

KAYAGAKI, N. S. *et al.* Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, p. 117–121, 2011.

KHAN, M. S. *et al.* Dietary Supplementation of the antioxidant Curcumin halts systemic LPS-induced neuroinflammation associated neurodegeneration and memory synaptic impairment via the JNK/NF- κ B/Akt signaling pathway in adult rats. **Oxid Med Cell Longev**, p. 1-23, 2019.

KHOTA, R. R; LUTHRIA, D. L. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. **Molecules**, v. 24, p. 2930, 2019.

KODALI, M. *et al.* Curcumin treatment leads to better cognitive and mood function in a model of Gulf War Illness with enhanced neurogenesis, and alleviation of inflammation

and mitochondrial dysfunction in the hippocampus. **Brain Behav Immun**, v. 69, p. 499–514, 2018.

KOL, A. *et al.* Astrocytes contribute to remote memory formation by modulating hippocampal–cortical communication during learning. **Nature Neuroscience**, v. 23, p. 1229–1239, 2020.

KUO, C. P. *et al.* Neuroprotective effect of curcumin in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage. **Anesthesiology**, v. 115, n. 6, p. 1229-1239, 2011.

LEAL, G; BRAMHAM, C. R; DUARTE, C. B. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. **Vitam Horm**, v. 104, p. 123-195, 2017.

LERI, M. *et al.* Healthy Effects of Plant Polyphenols: **Molecular Mechanisms**, v. 21, n. 4, p. 1250, 2020.

LEO, E. E. M; CAMPOS, M. R. S. Systemic oxidative stress: a key point in neurodegeneration – A review. **J Nutr Health Aging**, v. 1, p. 1-6, 2019.

LI, W. *et al.* Curcumin by down-regulating NF-κB and elevating Nrf2, reduces brain edema and neurological dysfunction after cerebral I/R. **Microvasc Res**, v. 106, p. 117-27, 2016.

LI, W. *et al.* Curcumin promotes functional recovery and inhibits neuronal apoptosis after spinal cord injury through the modulation of autophagy. **J Spinal Cord Med**, v. 44, n. 1, p. 37-45, 2021.

LIU, Y. F. Efficacy and therapeutic potential of Curcumin against sepsis-induced chronic lung injury in male albino rats. **J Nutr Health Aging**, v. 21, n. 3, p. 307-313, 2017.

LIU, D. *et al.* Effects of curcumin on learning and memory deficits, BDNF, and ERK protein expression in rats exposed to chronic unpredictable stress. **Behavioural Brain Research**, v. 271, p. 116-121, 2014.

LISMAN, J. *et al.* How the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. **Nat Neurosci**, v. 20, p. 1434–1447, 2017.

LUO, L. *et al.* Sestrin 2 attenuates sepsis- associated encephalopathy through the promotion of autophagy in hippocampal neurons. **Journal of Cellular and Molecular Medicin**, v. 24, n. 12, p. 6634-6643, 2020.

LINNERBAUER. M; WHEELER. M. A; QUINTANA, F. J. Astrocyte crosstalk in CNS inflammation. **Neuron**, v. 108, p. 1-15, 2020.

MALDONADO, J. R. Neuropathogenesis of delirium: review of current etiologic theories and common pathways. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 21, n. 12, p. 1190-1222, 2013.

MANFREDINI, A *et al.* Mitochondrial dysfunction is associated with long-term cognitive impairment in an animal sepsis model. **Clinical Science**, v. 133, p. 1993–2004, 2019.

MANSOUR, A. H; HASSAN, A. W; GEORGY, S. G. Neuroinflammatory reactions in sickness behavior induced by bacterial infection: Protective effect of minocycline. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 32, n. 2, 2018.

MAZZANTI, G; GIACOMO, S. D. Curcumin and Resveratrol in the management of cognitive disorders: What is the clinical evidence? **Molecules**, v. 21, p. 1243, 2016.

MEI, X. *et al.* Interplay of Curcumin and its liver metabolism on the level of A β in the brain of APP^{swe}/PS1^{dE9} mice before AD onset. **Pharmacological Reports**, v. 72, n. 6, p. 1604-1613, 2020.

MESSING, A; BRENNER, M. GFAP at 50. **ASN Neuro**, v. 0, p. 1-23, 2020.

METHA, K. *et al.* Curcumin supplementation shows modulatory influence on functional and morphological features of hippocampus in mice subjected to arsenic trioxide exposure. **Anatomy and Cell Biology**, v. 53, p. 355-365, 2019.

MEHMET, O. Z. *et al.* Curcumin alleviates cisplatin-induced learning and memory impairments. **Neurobiol Learn Mem**, v. 123, p. 43-49, 2015.

MICHELON, C. *et al.* The role of secretase pathway in long-term brain inflammation and cognitive impairment in an animal model of severe sepsis. **Mol Neurobiol**, v. 57, n. 2, p. 1159-1169, 2019.

MOLNAR, L. *et al.* Sepsis associated encephalopathy: a review of literature. **Neurol India**, v. 66, p. 352–361, 2018.

MONROY, A; GORDON, J. L; SILVESTRE, A. Curcumin and neurodegenerative diseases. **Biofactors**, v. 39, n. 1, p. 122-132, 2013.

MORAES, A. *et al.* Activated microglia-induced deficits in excitatory synapses through IL-1 β : implications for cognitive impairment in sepsis. **Molecular neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 653-663, 2014.

MORETTI, R. L. *et al.* Behavioral and morphological effects of resveratrol and Curcumin in rats submitted to doxorubicin-induced cognitive impairment. **Research in Veterinary Science**, v. 140, p. 242–250, 2021.

MOURÃO-JÚNIOR, C. A; FARIA, N. C. Memory. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 28, n. 4, p. 780-788, 2015.

NAM, S. M. *et al.* Effects of Curcumin (*Curcuma longa*) on Learning and spatial memory as well as cell proliferation and neuroblast differentiation in adult and aged mice by upregulating brain derived neurotrophic factor and CREB signaling. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 6, p. 641-649, 2014.

NANKI, A. A. *et al.* Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF- κ B-dependent genes. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, p. 284, 2003.

NAPIER, B. A. *et al.* Complement pathway amplifies caspase-11-dependent cell death and endotoxin-induced sepsis severity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 11, p. 2365–2382, 2016.

NEVES, B. H. S. **Papel do sistema dopaminérgico nos déficits de memória induzidos pela privação maternal**. 80 f. 2020. (Mestrado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2020.

NIMSE, S. B, PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

NISHINAKA, T. *et al.* Curcumin activates human glutathione S-transferase P1 expression through antioxidant response element. **Toxicol Lett.** v, 170, p, 238–247, 2007.

NORRIS, D, Short-term memory and long-term memory are still different. **Psychol Bull**, v. 143, n. 9, p. 992-1009, 2017.

NUNES, P. T. *et al.* Thalamic proteome changes and behavioral impairments in thiamine-deficient rats. **Neuroscience**, v. 385, p. 181-197, 2018.

OKSANEN, M. *et al.* NF-E2-related factor 2 activation boosts antioxidant defenses and ameliorates inflammatory and amyloid properties in human Presenilin-1 mutated Alzheimer's disease astrocytes. **Glia**, v. 68, n. 3, p. 589-599, 2020.

OLIVEIRA, P. S. Os novos conceitos de sepse e choque séptico. **Revista Renovare**, v. 2, 2020.

OLIVIERI, R. *et al.* The additive effect of aging on sepsis-induced cognitive impairment and neuroinflammation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 314, p. 1-7, 2018.

OZ, M. *et al.* Curcumin alleviates cisplatin-induced learning and memory impairments. **Neurobiol Learn Mem**, v. 123, p. 43-49, 2015.

PAIÃO, H. G. O. **Sepse: Impacto na saúde pública do Brasil e na qualidade de vida dos sobreviventes**. 2015. 75 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Departamento de Ciências Biológicas e Saúde, Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo, 2015.

PANG, P.T. *et al.* Regulation of late phase LTP in normal and aging hippocampus: role of secreted protein tPA and BDNF. **Ageing Res Rev**, v. 3, p. 407-430, 2004.

PARK, C. H. *et al.* Neuroprotective effects of tetrahydrocurcumin against glutamate-induced oxidative stress in hippocampal HT22 cells. **Molecules**, v. 25, n. 155, 2020.

PARKER, S. J; WATKINS, P. E. Experimental models of gram-negative sepsis. **Journal of British Surgery**, v. 88, n. 1, p. 22-30, 2001.

PEKNY, M; PEKNA, M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. **Physiol Rev**, v. 94, p. 1077-1098, 2014.

PENG, L. *et al.* Effects of curcumina on mRNA expression of cytokines related to toll-like receptor 4 signaling in THP-1 cells. **Chinese Journal of Dermatology**, v. 43, n. 7, p. 493-496, 2010.

PISOSCHI, A. M. *et al.* The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**, v. 97, n. 5, p. 55- 74, 2015.

POPPENK, J. *et al.* Why is the meaning of a sentence better remembered than its form? An fMRI study on the role of novelty-encoding processes. **Hippocampus**, v. 18, p. 909–918, 2008.

PRAKASH, A; KUMAR, A. Role of nuclear receptor on regulation of BDNF and neuroinflammation in hippocampus of β -amyloid animal model of Alzheimer's disease. **Neurotox Res**, v. 25, p. 335–347, 2014.

PRESCOTT, H. C. *et al.* Enhancing recovery from sepsis: a review. **JAMA**, v. 319, p. 62–75, 2018.

RATHINAM, V. A. *et al.* TRIF licenses caspase-11- dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. **Cell**, v. 50, p. 606–619, 2013.

REIS, L. **Efeito da curcumina sobre as alterações comportamentais e termorregulatórias durante o desafio imunológico com lipopolissacarídeo**. 87 f. 2018. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2018.

REIS, L. *et al.* Curcumin attenuates LPS-induced sickness behavior and fever in rats by modulating Nrf2 activity. **Neurosci Lett**, v. 271, p. 116-121, 2022.

RILC, N. K; SOVA, M; KRISTL, J. Drug delivery strategies for Curcumin and other natural Nrf2 modulators of oxidative stress related diseases. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 2137, 2021.

RODRIGUEZ-GOMEZ, J. A. *et al.* Microglia: agents of the CNS pro-inflammatory Response. **Cells**, v. 9, p. 1717, 2020.

ROTHMAN, M. *et al.* Sepsis as 2 problems: Identifying sepsis at admission and predicting onset in the hospital using an electronic medical record–based acuity score. **Journal of Critical Care**, v. 38, p. 237-244, 2017.

SANDUR, S. K. *et al.* Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of Curcumin (diferuloylmethane). **Free Radic Biol Med**, v. 43, p. 568–580, 2007.

SANTELLLO, M; TONI, N; VOLTERRA, A. Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. **Nature. Neuroscience**, v. 22, p. 154–166, 2019.

SÃO PEDRO, T. C. **Etiologia e manifestações clínicas e evolutivas da sepse em crianças e adolescentes internados em unidade de terapia intensiva**. 52 f. 2016. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente). Departamento de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

SCHEDLOWSKI, M; ENGLER, H; GRIGOLEIT, J. S. Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: a model to disentangle immune-to-brain communication. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 35, p. 1-8, 2014.

SCAPAGNINI, G. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: A nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. **Mol Neurobiol**, v. 44, n. 2, p. 192–201, 2011.

SEMMLER, A. *et al.* Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 30, n. 2, p. 144-157, 2005.

SEONG, K. J. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate rescues LPS-impaired adult hippocampal neurogenesis through suppressing the TLR4-NF- κ B signaling pathway in mice. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 20, p. 41–51, 2016.

SHARMA, C. *et al.* Curcumin and Resveratrol rescue cortical hippocampal system from chronic fluoride induced neurodegeneration and enhance memory retrieval. **Int J Neurosci**, v. 128, n. 11, p. 1007-1021, 2018.

SEKERES, M. J; WINOCUR, G; MOSCOVITCH, M. The hippocampus and related neocortical structures in memory transformation. **Neurosci Lett**, v. 680, p. 39-53, 2018.

SEONG, K. J. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate rescues LPS-impaired adult hippocampal neurogenesis through suppressing the TLR4-NF- κ B signaling pathway in mice. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 41-51, 2016.

SERAFINI, M. M. *et al.* Curcumin in Alzheimer's disease: Can we think to new strategies and perspectives for this molecule? **Pharmacological Research**, v. 124, p. 146-155, 2017.

SHEN, Y. *et al.* CXCR5 knockdown attenuates hippocampal neurogenesis deficits and cognitive impairment in a mouse model of sepsis-associated encephalopathy. **Neuroscienc**, v. 433, p. 212-220, 2020.

SINGER, M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 66–72, 2014.

SINGER, Mervyn et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SIOPI, F. *et al.* Evaluation of late cognitive impairment and anxiety states following traumatic brain injury in mice: the effect of minocycline. **Neurosci Lett**, v. 511, n. 2, p. 110-115, 2012.

SIQUEIRA, L. D. **Estudo dos mecanismos de déficit cognitivo associado ao envelhecimento: o papel da resposta inflamatória**. 84 f. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Departamento de Biologia Celular e Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

SOFRONIEW, M. V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. **Neuroscience**, v. 16, p. 249-261, 2015.

SOFRONIEW, M. V. Astrocyte reactivity: Subtypes, states and functions in CNS innate immunity. **Trends Immunol**, v. 41, n. 9, p. 758-770, 2020.

SONNEVILLE, R. *et al.* Understanding brain dysfunction in sepsis. **Ann Intensive Care**, v. 3, p. 15-23, 2013.

SOUZA, D. C. **Epidemiologia da sepse em crianças internadas em unidades de terapia intensiva pediátrica da América Latina**. 155. f 2016. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016.

SOUZA, A. L. J. **Sepse induz alteração em memória a longo prazo de camundongos jovens: possível mecanismo neurogênico**. 68 f. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

STUART, M. J. *et al.* Knockout of CXCR5 581 increases the population of immature neural cells and 582 decreases proliferation in the hippocampal dentate gyrus. **J. Neuroinflammation**, v. 11, n. 31, 2014.

SU. W; DING. X. Methods of Endotoxin Detection. **Journal of Laboratory Automation**, v. 20, n. 4, p. 354-364, 2015.

SUNDARAM, J. R. *et al.* Curcumin ameliorates neuroinflammation, neurodegeneration, and memory deficits in p25 transgenic mouse model that bears hallmarks of Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, v. 60, n. 4, p. 1429-1442, 2017

TABRIZI, R. *et al.* The effects of curcumin containing supplements on biomarkers of inflammation and oxidative stress: A systematic review and meta- analysis of randomized controlled trials. **Phytotherapy Research.**, v. 33, p. 253–262, 2019.

- TANG, L. *et al.* Differential Functional Connectivity in Anterior and Posterior Hippocampus Supporting the Development of Memory Formation. **Front Hum Neurosci**, v. 14, n. 204, p. 1-18, 2020.
- TELLO-FRANCO, V; LOZADA-GARCÍA, M. C; SORIANO-GARCÍA, M. Experimental and Computational Studies on the Inhibition of Acetylcholinesterase by Curcumin and Some of its Derivatives. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 9, n. 2, p. 289-298, 2012.
- TIAN, J. *et al.* Atorvastatin relieves cognitive disorder after sepsis through reverting inflammatory cytokines, oxidative stress, and neuronal apoptosis in hippocampus. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 40, n. 4. p. 521-530, 2020.
- TINTORELLI, R. *et al.* Spatial-memory formation after spaced learning involves ERKs1/2 activation through a behavioral-tagging process. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.
- TOYAMA, R. P. *et al.* **Avaliação comportamental e bioquímica de camundongos submetidos a um modelo experimental de inflamação associada a criolesão**. 68 f. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), Departamento de Ciências Médicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- TROMBETTA, I. C. *et al.* Níveis Séricos do BDNF na Proteção Cardiovascular e em Resposta ao Exercício. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, p. 263-269, 2020.
- TSAI, I. C. *et al.* The Effect of Curcumin Differs on Individual Cognitive Domains across Different Patient Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 12, p. 1235, 2021.
- TSURUTA, R; ODA, Y. A clinical perspective of sepsis-associated delirium. **Journal of Intensive Care**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2016.
- TUON, L. *et al.* Imipramine reverses the depressive symptoms in sepsis survivor rats. **Intensive Care Medicine**, v. 33, n. 12, p. 2165-2167, 2007.
- TUON, L. *et al.* Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. **Intensive Care Medicine**, v. 34, n. 9, p. 1724-1731, 2008.
- VACCHARAJANI, V. *et al.* Curcumin modulates leukocyte and platelet adhesion in murine sepsis. **Microcirculation**, v. 17, n. 6, p. 407-416, 2010.
- VALERO, J. *et al.* Long-term effects of an acute and systemic administration of LPS on Adult neurogenesis and spatial memory. **Front Neurosci**, v. 8, p. 83, 2014.
- VASCONCELOS, A. R. *et al.* Nrf2/ARE pathway modulation by dietary energy regulation in neurological disorders. **Front. Pharmacol**, v. 10, p. 33, 2019.
- VERKHRATSKY, A. *et al.* Astroglial atrophy in Alzheimer's disease. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 471, n. 10, p. 1247-1261, 2019.

VINCENT, J. L. *et al.* Sepsis definitions: time for change. **Lancet**, v. 381, n. 9868, p. 774, 2013.

WINDMANN, C. N. *et al.* Long-term cerebral consequences of sepsis. **The Lancet Neurolog**, v. 13, n. 6, p. 630-636, 2014.

WANG, H. *et al.* Trajectory of cognitive decline after sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 49, n. 7, p. 1083-1094, 2021.

WANG, L. *et al.* Lipopolysaccharide endotoxemia induces amyloid-beta and p-tau formation in the rat brain. **Am J Nucl Med Mol Imaging**, v. 8, p. 86-99, 2018.

WANG, P. *et al.* Prolonged soluble epoxide hydrolase reactivity in brain endothelial cells is associated with long cognitive deficits in sepsis. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 6, p. 2846-2855, 2020.

WILCONSON, J. S. *et al.* Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor α . **Behavioural Brain Research**, v. 177, p. 109-116, 2007.

WU, J. *et al.* Neuroprotection by Curcumin in Ischemic Brain Injury Involves the Akt/Nrf2 Pathway. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 1-9, 2013.

WU, X. *et al.* Curcumin attenuates surgery-induced cognitive dysfunction in aged mice. **Metab Brain Dis**, v. 32, n. 3, p. 789-798, 2017.

YANG, C. *et al.* Protective effect of curcumin against cardiac dysfunction in sepsis rats. **Pharm. Biol**, v. 51, n. 4, p. 482-487, 2013.

YANG, Z; WANG, K. K. W. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. **Trends Neuroscience**, v. 38, n. 6, p. 364-374, 2015.

YENDE, S. *et al.* Long-term quality of life among survivors of severe sepsis: analyses of two international trials. **Crit Care Med**, v. 44, n. 8, p. 1461-1467, 2016.

YOKOO, H. *et al.* Neurodegenerative evidence in mice brains with cecal ligation and puncture-induced sepsis: preventive effect of the free radical scavenger edaravone. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. 11-23, 2012.

YOUNG, H. F. *et al.* Inhibition of homodimerization of toll-like receptor 4 by curcumin. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 68-69, 2006.

XIÃO, X. *et al.* Curcumin protects against sepsis-induced acute lung injury in rats. **J Surg Res**, v. 176, n. 1, p. 31-39, 2012.

XIE, Y. *et al.* Curcumin ameliorates cognitive deficits heavy ion irradiation-induced learning and memory deficits through enhancing of Nrf2 antioxidant signaling pathways. *Pharmacol. Biochem Behav*, v. 126, p. 181–186, 2014.

XIE, Y. L. *et al.* Curcumin attenuates lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury by activating Nrf2 nuclear translocation and inhibiting NF- κ B activation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 91, p. 70-77, 2017.

XU, X. *et al.* Caspase-1 inhibitor exerts brain-protective effects against sepsis associated encephalopathy and cognitive impairments in a mouse model of sepsis. *Brain, Behavior, Immunity*, v. 1, p. 859-870, 2017.

XU, J. *et al.* Combination of Curcumin and vagus nerve stimulation attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury-induced behavioral deficits. *Biomed Pharmacother*, v. 103, p. 614-620, 2018.

ZAGHLOUL, N. *et al.* Forebrain cholinergic dysfunction and systemic and brain inflammation in murine sepsis survivors. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1673, 2017.

ZAMPIERI, F. G. *et al.* Sepsis associated encephalopathy: not just delirium. *Clinics*, v. 66, p. 1825-1831, 2011.

ZHANG, Q. H. *et al.* Septic encephalopathy: when cytokines interact with acetylcholine in the brain. *Military Medical Research*, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2014a.

ZHANG, Y. *et al.* Discovery and evaluation of novel antiinflammatory derivatives of natural bioactive curcumin. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 8, p. 2161–2171, 2014b.

ZHANG, L. *et al.* Curcumin improves amyloid β -peptide (1-42) induced spatial memory deficits through BDNF-ERK signaling pathway. *PLOS one*, v. 10, n. 6, p. 1-17, 2015.

ZHOU, J. *et al.* Curcumin suppresses apoptosis and inflammation in hypoxia/reperfusion exposed neurons via WNT signaling pathway. *Med Sci Monit*, v. 26, p. 1-7, 2020.

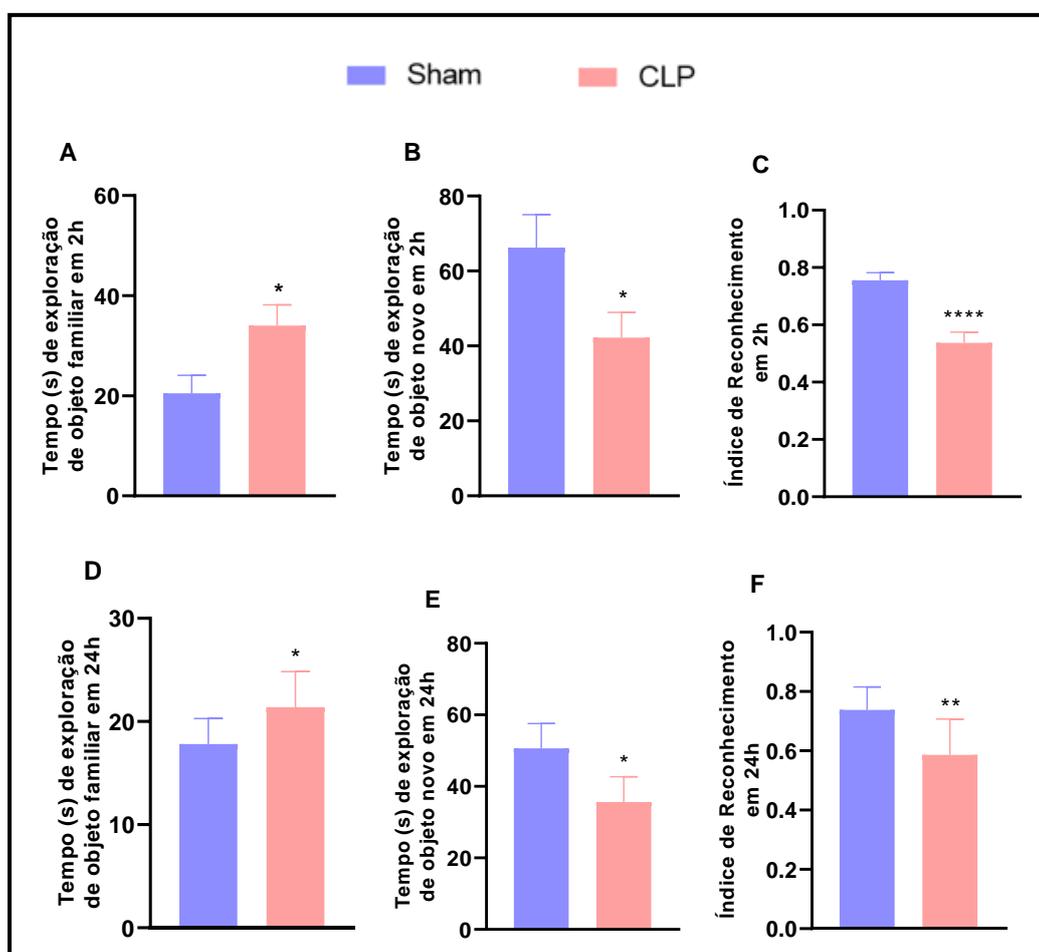
ZONTA, F. N. S. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of sepsis in a public hospital of Paraná. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 8, n. 3, p. 224-231, 2018.

ZUJALOVIC, B. *et al.* AChE-activity in critically ill patients with suspected septic encephalopathy: a prospective, single-centre study. *BMC Anesthesiology*, v. 20, n. 287, p. 1-10, 2020.

ANEXO 1

A seguir, as Figuras 22, 29 e 30 mostram respectivamente o desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos 10, 20 ou 30 dias após a indução da sepse.

Figura 28– Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos, 10 dias após a simulação ou indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.



Fonte: Autora.

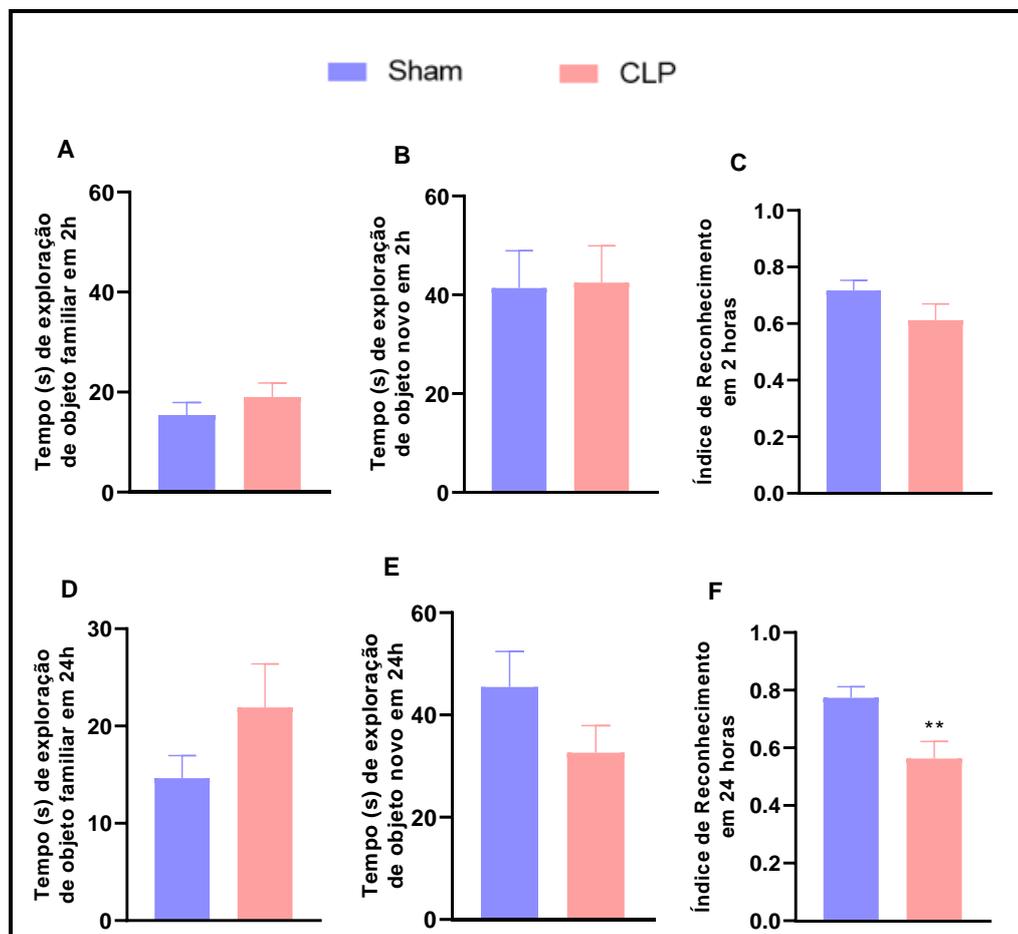
Nota: Em A e D, temos o parâmetro tempo de exploração ao objeto familiar (s). Em B e E, o parâmetro tempo de exploração ao objeto novo (s). Em C e F, o parâmetro índice de reconhecimento de objetos em animais sobreviventes há 10 dias após cirurgia de ligação e perfuração cecal (n = 10). Estatística: teste de *t*-Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ comparados ao grupo Sham.

Tabela 16 - Análise do tamanho do efeito por meio do d Cohen no teste reconhecimento de objetos, entre os grupos Sham e CLP, 10 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.

Parâmetros	d Cohen	
	2h	24h
Tempo de exploração ao objeto familiar	$d = 1,07$	$d = 1,07$
Tempo de exploração ao objeto novo	$d = 1,34$	$d = 1,34$
Índice de reconhecimento	$d = 2,51$	$d = 2,51$

Fonte: Autora.

Figura 29 – Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos, 20 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal



Fonte: Autora.

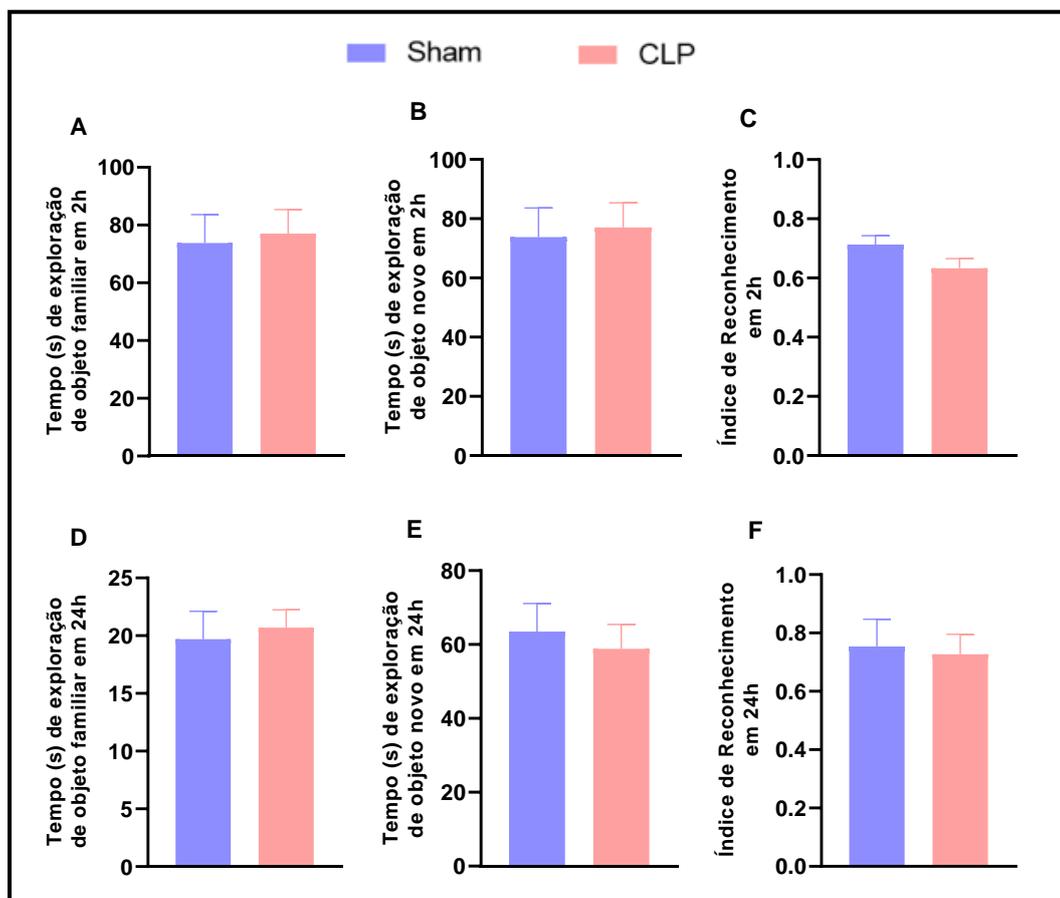
Nota: Em A e D, temos o parâmetro tempo de exploração ao objeto familiar (s). Em B e E, o parâmetro tempo de exploração ao objeto novo (s). Em C e F, o parâmetro índice de reconhecimento de objetos em animais sobreviventes há 20 dias após cirurgia de ligação e perfuração cecal. Estatística: teste de *t*-Student ($n = 10$). ** $p < 0,001$ comparado ao grupo Sham

Tabela 17- Análise do tamanho do efeito por meio do teste *d* Cohen no teste reconhecimento de objetos, em grupos Sham e CLP, 20 dias após a indução da sepse pela cirurgia de ligação e perfuração cecal.

Parâmetros	<i>d</i> Cohen	
	2h	24h
Tempo de exploração ao objeto familiar	$d = 0,48$	$d = 0,64$
Tempo de exploração ao objeto novo	$d = 0,21$	$d = 0,59$
Índice de reconhecimento	$d = 0,88$	$d = 1,28$

Fonte: Autora.

Figura 30– Desempenho comportamental em animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos, 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal



Fonte: Autora.

Nota: Em A e D, temos o parâmetro tempo de exploração ao objeto familiar (s). Em B e E, o parâmetro tempo de exploração ao objeto novo (s). Em C e F, o parâmetro índice de reconhecimento de objetos em animais sobreviventes há 30 dias após cirurgia de ligação e perfuração cecal. Estatística: teste de *t*-Student (n = 10).

Tabela 18 - Análise do tamanho do efeito por meio do teste *d* Cohen no teste reconhecimento de objetos, em grupos Sham e CLP, 30 dias após a indução da sepse por ligação e perfuração cecal.

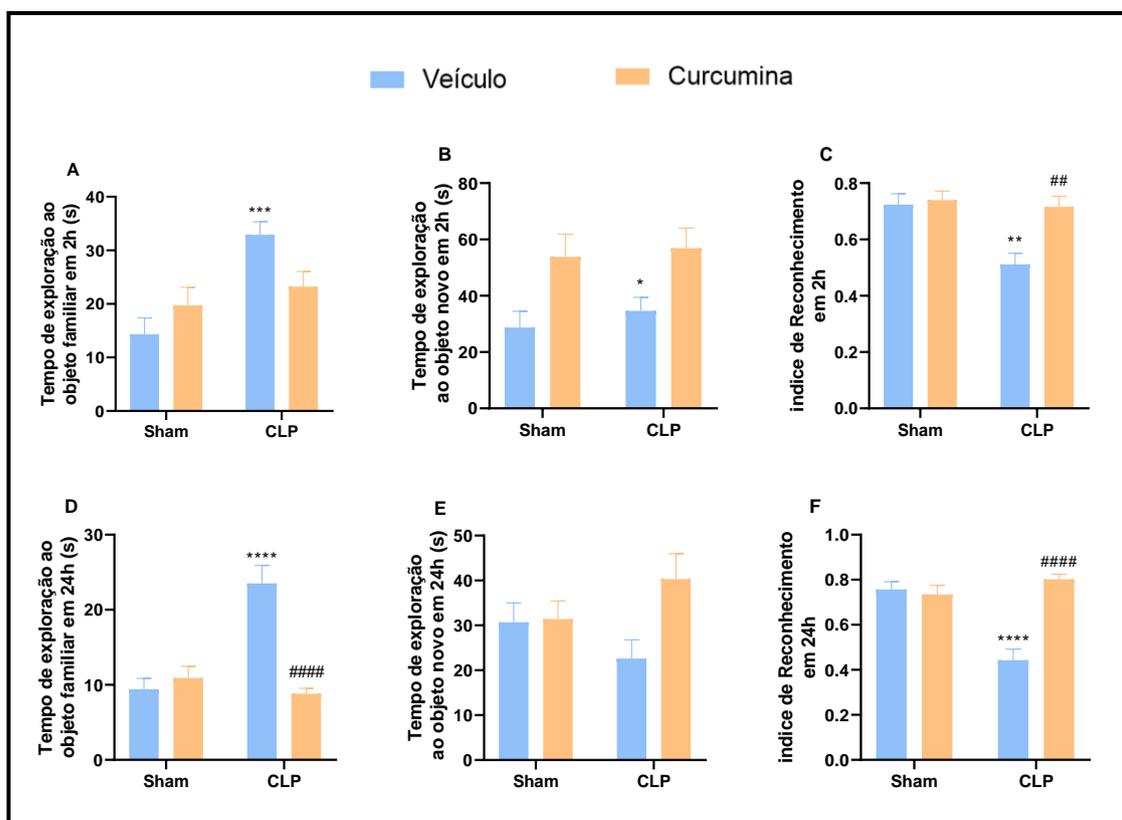
V	Parâmetros	<i>d</i> Cohen	
		2h	24h
	Tempo de exploração ao objeto familiar	$d = 0,67$	$d = 0,15$
	Tempo de exploração ao objeto novo	$d = 0,07$	$d = 0,29$
	Índice de reconhecimento	$d = 0,91$	$d = 0,40$

Fonte: Autora

ANEXO 2

A seguir, a Figura 31 mostra o desempenho comportamental no teste de campo aberto em animais submetidos à cirurgia de ligação e perfuração cecal e posteriormente ao tratamento com curcumina (50 mg/kg, p.o).

Figura 31 – Desempenho comportamental no teste de reconhecimento de objetos em animais submetidos à indução da sepse por ligação e perfuração cecal e ao tratamento com veículo ou curcumina



Fonte: Autora.

Nota: Em A e D, temos o tempo de exploração ao objeto familiar (s), em B e E o tempo de exploração ao objeto novo (s) e em C e F, o índice de reconhecimento em 2 e 24 horas respectivamente em animais Sham e CLP tratados com veículo ou curcumina (50 mg/kg, p.o), após simulação ou indução da sepse por ligação e perfuração cecal há 10 dias. Estatística: ANOVA duas vias seguida de teste de Tukey (n = 10): * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ e **** $p < 0,0001$ comparados ao grupo controle, ## $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ comparado ao grupo CLP+veículo.

Tabela 19 - Análise de variância de duas vias e do tamanho do efeito por meio do teste ômega-quadrado no teste de reconhecimento de objetos em grupos Sham e CLP (cirurgia) tratados com veículo ou curcumina (tratamento).

Parâmetros	Cirurgia	Tratamento	Interação
Tempo de exploração ao objeto familiar 2h	F (1, 36) = 13,90 P = 0,0007 $\omega^2 = 8,93$	F (1, 36) = 0,5262 P = 0,4729 $\omega^2 = -0,32$	F (1, 36) = 6,488 P = 0,0153 $\omega^2 = 3,80$
Tempo de exploração ao objeto novo 2h	F (1, 36) = 0,4660 P = 0,4992 $\omega^2 = -0,99$	F (1, 36) = 12,93 P = 0,0561 $\omega^2 = -0,97$	F (3, 72) = 0,3413 P = 0,7956 $\omega^2 = -0,99$
Índice de Reconhecimento 2h	F (1, 34) = 10,01 P = 0,0033 $\omega^2 = 0,003$	F (1, 34) = 8,630 P = 0,0059 $\omega^2 = 0,002$	F (1, 34) = 6,297 P = 0,0170 $\omega^2 = 0,001$
Tempo de exploração ao objeto familiar 24h	F (1, 36) = 13,21 P = 0,0009 $\omega^2 = 5,49$	F (1, 36) = 15,98 P = 0,0003 $\omega^2 = 6,16$	F (1, 36) = 24,07 P < 0,0001 $\omega^2 = 9,49$
Tempo de exploração ao objeto novo 24h	F (1, 36) = 0,007604 P = 0,9310 $\omega^2 = -0,83$	F (1, 36) = 4,022 P = 0,0525 $\omega^2 = 2,55$	F (1, 36) = 3,434 P = 0,0721 $\omega^2 = 2,05$
Índice de Reconhecimento 24h	F (1, 36) = 10,69 P = 0,0024 $\omega^2 = 0,003$	F (1, 36) = 19,89 P < 0,0001 $\omega^2 = 0,006$	F (1, 36) = 25,43 P < 0,0001 $\omega^2 = 0,008$

Fonte: Autora.

ANEXO 3


**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO Universidade Federal
de Alfenas. Unifal-MG**

 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito da curcumina sobre o *sickness behavior* em ratos", registrada com o nº 39/2018, sob a responsabilidade de Alexandre Giusti Paiva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAUNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 18/02/2019 a 30/01/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	436
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 18 de Fevereiro de 2019.