

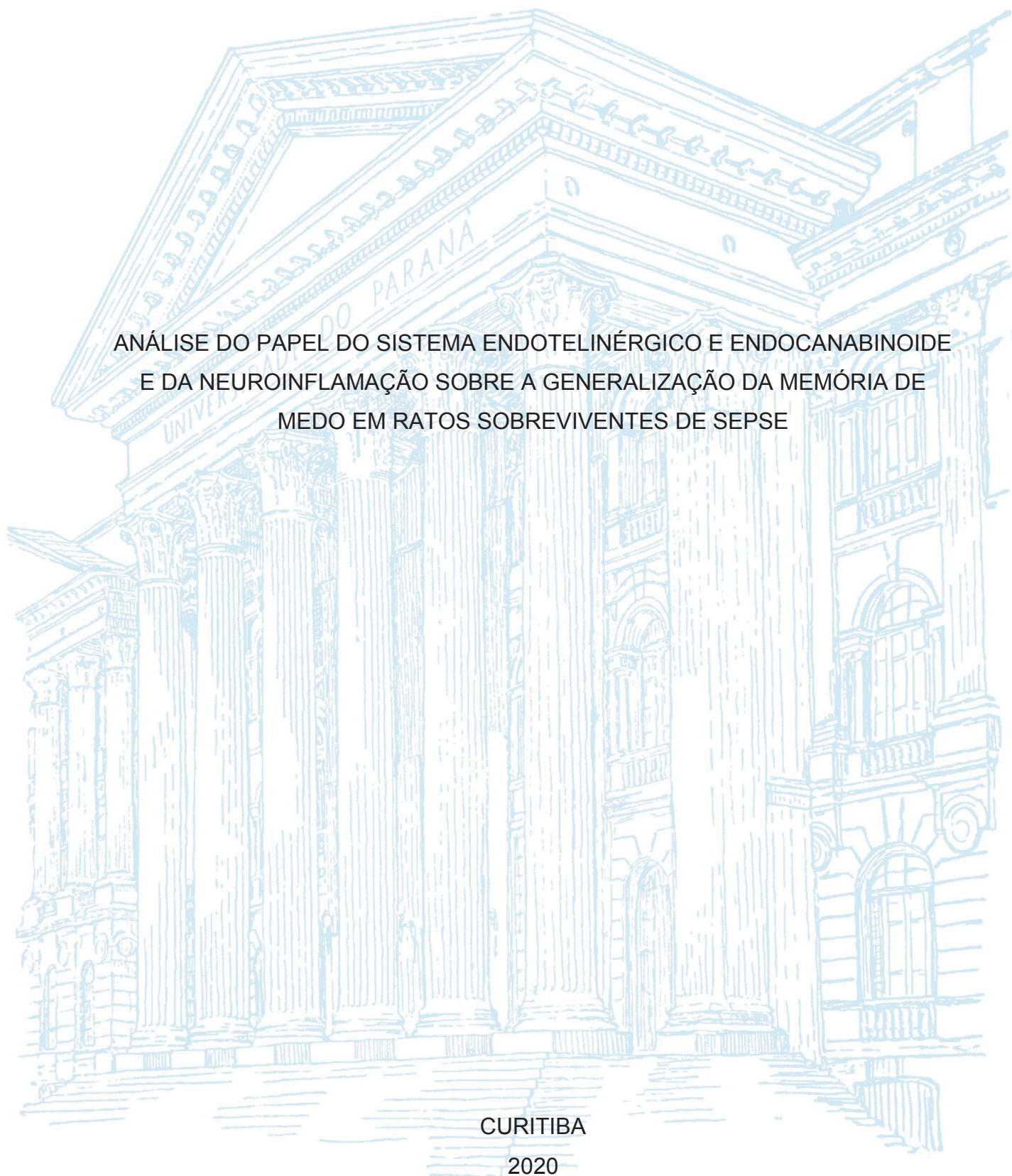
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAYCON EDUARDO MATIAS

ANÁLISE DO PAPEL DO SISTEMA ENDOTELINÉRGICO E ENDOCANABINOIDE
E DA NEUROINFLAMAÇÃO SOBRE A GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE
MEDO EM RATOS SOBREVIVENTES DE SEPSE

CURITIBA

2020



MAYCON EDUARDO MATIAS

ANÁLISE DO PAPEL DO SISTEMA ENDOTELINÉRGICO E ENDOCANABINOIDE
E DA NEUROINFLAMAÇÃO SOBRE A GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE
MEDO EM RATOS SOBREVIVENTES DE SEPSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

Coorientadora: Prof^a. Dra. Cristina Aparecida Jark Stern

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Matias, Maycon Eduardo

Análise do papel do sistema endotelinérgico e endocanabinoide e da neuroinflamação sobre a generalização da memória de medo em ratos sobreviventes de sepse. / Maycon Eduardo Matias. – Curitiba, 2020.
72 p.: il.

Orientador: Aleksander Roberto Zamprônio
Coorientadora: Cristina Aparecida Jark Stern

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Memória. 2. Inflamação. 3. Endocanabinoides. 4. Receptores de endotelina. 5. Transtornos de estresse pós-traumáticos. I. Título II. Zamprônio, Aleksander Roberto, 1967-. III. Stern, Cristina A. J. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 615.78



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
4000101/2038FD

TERMO DE APROVAÇÃO

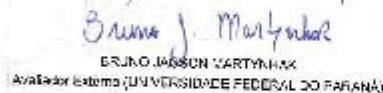
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MAYCON EDUARDO MATIÁS**, intitulada: **ANÁLISE DO PAPEL DO SISTEMA ENDOTELINÉRGICO E ENDOCANABINOIDE E DA NEUROINFLAMAÇÃO SOBRE A GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO EM RATOS SOBREVIVENTES DE SÉPSE**, sob orientação do Prof. Dr. **ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO**. após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Janeiro de 2020.


ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO
Presidente da Banca Examinadora


PRISCILA DE SOUZA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAÍ)


BRUNO J. MARTYNIAK
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

À Sônia, que deu início a isso tudo
À Lúcio, que me acompanhou
À Margareth, minha motivação
Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Aleksander Zamprônio, cuja retidão e profissionalismo exemplares me guiaram durante os anos de trabalho contidos nesta publicação. Agradeço o aconselhamento, apoio e por todo o conhecimento obtido neste mestrado.

À minha coorientadora, Professora Cristina Jark Stern, peça fundamental neste trabalho e na minha formação. Por contribuir com suas considerações, com muitos dos materiais utilizados e pelos recursos humanos que se tornaram amigos.

À minha companheira, Margareth de Mello Brandenburg, ao meu lado em todos os momentos deste mestrado. Motivo pelo qual o comecei, o continuei e o terminei. Que fez as dificuldades ficarem mais fáceis. As frustrações, mais felizes. As injustiças, toleráveis. E a conclusão, fortuna. Àquela com quem aprendo todos os dias, neste capítulo da minha jornada você foi a melhor parte.

À minha mãe, Sônia Helena Otto Matias, que me ensinou o valor da dedicação e da educação. Que esta pode mudar vidas. A breve conclusão da sua jornada enobreceu a minha, e me faz valorizar ainda mais o tempo que me é dado.

Ao meu pai, Lúcio Francisco Matias, que me ensinou o valor do trabalho. Que a medida de uma pessoa e seu caráter pouco tem a ver com chegar ao final de um dia com as mãos sujas de graxa ou a roupa suja de giz. E que a virtuosidade está na bondade, e não no reconhecimento dela.

A Dulce, Raimundo, Diogo e Sílvio, porque a família é um suporte de valor imensurável.

À minha amiga Débora Rasec Radulski, pelos momentos compartilhados na execução do projeto e na vivência no laboratório. Pelos aniversários fazendo cirurgia, pelos bolos e pelos almoços na casa da Vó.

Ao meu amigo Thiago Rodrigues da Silva, pela dedicação ao projeto, pelos longos dias de experimento terminando em longas noites de coleta de amostras. Mais um exemplo de que a educação transforma vidas.

À Ana Maria Raymundi, as considerações e a execução dos experimentos de Western Blot.

Aos meus amigos Felipe, Fernando, Fernanda e Priscila, a amizade, os desabafos, os aniversários, confraternizações e momentos felizes.

Aos meus colegas de laboratório Carlos, Diogo, Isabella, Juliana, Letícia, Luís e Mariane, o companheirismo, momentos compartilhados e seminários enriquecedores

Às agências de fomento CAPES, CNPq e Fundação Araucária, bem como a Universidade Federal do Paraná.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

“All we have to decide is what to do with the time that is given to us.”

J.R.R. Tolkien, *The Lord of the Rings*

RESUMO

O Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT) é uma doença multifatorial complexa vista em indivíduos que passaram ou testemunharam experiências com alto risco à vida. Ansiedade, depressão, pânico e re-experiência da memória traumática são sintomas comuns nesta doença. A patogênese inclui a formação de uma memória de medo generalizada e prejuízo em funções hipocâmpais como o padrão de separação, estando relacionada com diversos mecanismos incluindo o sistema endocanabinoide (eCB) e a neuroinflamação. A sepse, doença igualmente complexa que se manifesta como uma falência de órgãos com alto risco a vida e secundária a uma infecção que chega à corrente sanguínea, é capaz de induzir um ambiente neuroinflamatório severo e tem consequências de longo-prazo que incluem déficit cognitivo e o TEPT. Os sistemas endotelinérgico e eCB têm implicações importantes na sepse participando de respostas modulatórias sistema nervoso central (SNC) que medeiam a liberação de vasopressores, parâmetro determinante na hipoperfusão tecidual responsável pela falência de órgãos vista na sepse. Evidências apontam que o bloqueio pontual destes sistemas nas fases iniciais da sepse melhora desfechos como a taxa de sobrevivência e a resposta a vasopressores. Também, o sistema eCB participa da modulação da memória em regiões como o hipocampo. Neste estudo avaliamos a hipótese de que o bloqueio destes sistemas na fase inicial da sepse teria implicações na neuroinflamação e, tardiamente, na generalização da memória de medo (um modelo de TEPT). Ratos Wistar machos foram submetidos a Ligação e Perfuração do Ceco (CLP) para indução de sepse e receberam por via intracerebroventricular (i.c.v.) o antagonista de receptores ET_A (BQ123), de receptores CB_1 (AM251) ou CB_2 (AM630) ou ainda um inibidor da ativação de micróglia (minociclina) após 4 h. Foi avaliada a taxa de sobrevivência e a hiperalgesia mecânica diariamente até o oitavo dia após a CLP utilizando um analgesímetro eletrônico. No décimo dia, os animais foram submetidos a um protocolo de condicionamento de medo ao contexto para avaliação da generalização da memória de medo contextual. Neste protocolo os animais são submetidos a uma sessão de condicionamento a um estímulo aversivo. Em seguida, o comportamento de congelamento é avaliado como porcentagem em função do tempo total sob exposição primeiramente no mesmo contexto (Teste A1) e em um contexto novo e não pareado com estímulo aversivo (Teste B1). Este último é usado para avaliação da generalização da memória de medo. Os testes foram repetidos na semana seguinte (Teste A2 e B2). Ao final dos experimentos foram coletadas amostras de hipocampo dos animais para dosagem da proteína Arc como marcador para neurogênese. Ainda, avaliamos o efeito dos tratamentos na neuroinflamação ao dosar o fator de necrose tumoral α (TNF- α) no hipocampo dos animais 4 h após o tratamento, correspondendo a 8 h após a cirurgia, pico de indução de citocinas no SNC. Nossos resultados indicaram que a sepse induzida por CLP é capaz de gerar hiperalgesia mecânica que dura até cinco dias dependendo da severidade associada a sepse. Nos dias subsequentes os animais sham e submetidos a CLP apresentaram limiares mecânicos normais e similares. O condicionamento dos animais foi então iniciado e no 13º dia após a cirurgia os animais submetidos à CLP desenvolvem uma generalização da memória de medo o que não ocorreu com os animais falso-operados. Esta generalização permaneceu até o final dos experimentos (20 dias). Também temos evidência de que esta generalização possa estar relacionada a uma maior consolidação da memória de medo nos grupos que passaram por sepse. O bloqueio do receptor ET_A 4 h após a indução de sepse

aumentou a taxa de sobrevivência, mas não modificou a hiperalgesia nos tempos testados ou a generalização da memória. Por sua vez, o bloqueio do sistema eCB reverteu a generalização da memória sem causar efeitos sobre a hiperalgesia mas apenas o bloqueio CB₁ melhorou também a taxa de sobrevivência. A inibição da micróglia impediu a generalização da memória e reduziu os níveis de TNF- α no hipocampo, mas não modificou a taxa de sobrevivência ou a hiperalgesia. Exceto pela minociclina, nenhum dos outros tratamentos alterou a neuroinflamação induzida pela sepse. Os efeitos observados sobre a memória não envolvem alterações na neurogênese visto que a avaliação da expressão de Arc não foi diferente entre nenhum dos grupos experimentais. Assim, concluímos que o bloqueio ET_A e de receptores CB₁ são estratégias importantes no restabelecimento da taxa de sobrevivência associada a sepse, e que o bloqueio eCB da neuroinflamação podem ser mecanismos viáveis para prevenir consequências tardias como o TEPT. O bloqueio de receptores CB₁ durante a fase inicial da sepse parece ser uma estratégia interessante pois mostrou-se efetivo tanto na melhora na taxa de sobrevivência quanto nos déficits de memória subsequentes.

Palavras-chave: Sepse. Memória. Endocanabinoides. Endotelina. Neuroinflamação

ABSTRACT

Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD) is a complex multifactorial disease seen in individuals that underwent or witnessed life-threatening experiences. Anxiety, depression, panic and re-experiencing the traumatic memory are common symptoms. The pathogenesis of this disease includes the formation of a generalized fear memory as well as a loss of hippocampal functions, such as loss of pattern separation. These are correlated with an array of mechanisms that include the endocannabinoid (eCB) system and neuroinflammation. Sepsis is a disease as equally as complex that manifests itself as a life-threatening organ failure secondary to an infection that reaches systemic circulation. It induces a severe neuroinflammatory environment and has long-term consequences that include PTSD. The endothelinergic and eCB systems have important roles in sepsis by acting as central modulators of vasopressors release. These are crucial for survival in sepsis as a lack of adequate response to vasopressors and hypotension underlie the pathogenesis of organ failure in sepsis. Evidence shows that timed blockade of these systems in sepsis enhances survival rate and alters the response to vasopressors. Also, the eCB system modulates memory formation in regions such as the hippocampus. In this study we tested the hypothesis that by blocking these systems in early sepsis would have an effect in neuroinflammation and late generalization of fear memory (a model for PTSD). Male rats underwent Cecal Ligation and Puncture (CLP) for sepsis induction. As treatment, we administered the antagonists for either ET_A receptors (BQ123), CB_1 and CB_2 receptors (AM251 and AM630, respectively) or a microglia inhibitor (minocycline) via intracerebroventricular (i.c.v.) injection 4 h after CLP. We evaluated the survival rate and mechanical hyperalgesia every day after surgery for eight days. Mechanical threshold was measured using an electronic algesimeter. On the tenth day after surgery animals underwent a contextual fear conditioning (CMC) protocol that consisted of a familiarization session in a neutral context followed, the next day, by a conditioning session paired with an unconditioned aversive stimulus. Animals were tested on the following day in the same context (Test A1) with freezing response as an index of fear memory. A test in a novel unpaired neutral context was done the next day (Test B1) to evaluate generalization of fear memory as a measure for PTSD-like effect. Both tests were repeated a week after and all animals that underwent these were euthanized for obtaining hippocampus samples for western blot assay of the Arc protein, a marker for neurogenesis. Also, using different animals, we measured the concentration of a neuroinflammation marker, tumor necrosis factor α (TNF- α), 4 h after i.c.v. treatment, during sepsis-induced peak levels of cytokine expression in the central nervous system (CNS). Our results indicate that sepsis induced by CLP can generate mechanical hyperalgesia that lasts for up to five days depending on the severity associated with the procedure. After this period, all animals have similar mechanical threshold response. We also show that 13 days after CLP, conditioned animals express a generalized fear memory that lasts for up to 20 days, an effect not seen in sham-operated animals. Our evidence also points a possible mechanism underlying a more consolidated fear memory. Regarding treatments, blocking the ET_A receptors 4 h after sepsis increased the survival rate but had no effects in hyperalgesia, generalization of fear memory or neuroinflammation. On the other hand, blockade of eCB receptors reversed the generalization of fear memory, also not affecting mechanical hyperalgesia nor neuroinflammation, and only CB_1 receptor blockade reversed the generalization of fear memory. Microglial inhibition in early sepsis lowered

TNF- α levels in the hippocampus and late generalization of fear memory, without affecting survival rate or mechanical hyperalgesia. The observed effects in generalization of fear memory do not seem to be related with neurogenesis, as none of the treatments had any impact on Arc expression in the dorsal hippocampus regardless of treatment group or whether the group underwent CLP. Altogether the results show that blockade of ET_A receptors might be a strategy for better mortality-associated outcomes in sepsis. Also, eCB blockade and neuroinflammation inhibition are viable mechanisms to prevent late consequences of sepsis, such as PTSD. We highlight the CB₁ receptor blockade in this regard, as it also enhances survival rate.

Keywords: Memory. Sepsis. Endocannabinoid. Endothelin. Neuroinflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sepsis: Gradiente de definição da doença	19
Figura 2 – Eixo endotelinérgico/endocanabinoide no hipotálamo	22
Figura 3 – Efeitos da sepsis na hiperalgesia e generalização da memória	37
Figura 4 – Efeito do bloqueio central ET _A na sobrevivência, limiar mecânico e generalização da memória de medo em animais submetidos a sepsis	39
Figura 5 – Efeito do bloqueio central CB ₁ na sobrevivência, limiar mecânico e generalização da memória de medo em animais submetidos a sepsis	41
Figura 6 – Efeito do bloqueio central CB ₂ na sobrevivência, limiar mecânico e generalização da memória de medo em animais submetidos a sepsis	43
Figura 7 – Efeito da inibição da micróglia na sobrevivência, limiar mecânico e generalização da memória de medo em animais submetidos a sepsis	45
Figura 8 – Inibidor de micróglia reverte a neuroinflamação após CLP	47
Figura 9 – Western Blot da proteína Arc no Hipocampo Dorsal 20 dias após CLP ...	48
Figura 10 – Depleção do tônus eCB após a sepsis	55

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

V	- Veículo
2-AG	- 2-Araquidonoil Glicerol
Arc	- proteína do citoesqueleto regulada por atividade (do inglês <i>activity-regulated cytoskeletal protein</i>)
AVP	- Arginina-Vasopressina
CB ₁	- receptor Canabinoide Tipo 1
CB ₂	- receptor Canabinoide Tipo 2
CMC	- Condicionamento de Medo ao Contexto
CLP	- Ligação e Perfuração do ceco (do inglês, <i>Cecal Ligation and Puncture</i>)
eCB	- Endocanabinoide
ELISA	- Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ET	- Endotelina
ET _A	- Receptor Endotelinérgico Tipo A
ET _B	- Receptor Endotelinérgico Tipo B
FAAH	- <i>Fatty-Acid Amide Hydrolase</i> , hidrolase de ácidos-graxos amídicos
GAPDH	- <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> , (do inglês Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)
i.c.v.	- intracerebroventricular
IL	- Interleucina
MAGL	- Lipase de monoacilgliceróis (do inglês <i>Monoacylglycerol Lipase</i>)
Mino	- Minociclina
NMC	- Neurônio Magnocelular
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (do inglês <i>Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SIRS	- Síndrome da resposta imune sistêmica (do inglês <i>Systemic immune response syndrome</i>)
TEPT	- Transtorno do Estresse Pós-Traumático
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral α
US	- Estímulo Não-Condicionado (do inglês <i>Unconditioned Stimulus</i>)
UTI	- Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 O TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO	16
1.2 A SEPSE COMO EVENTO TRAUMÁTICO.....	18
1.3 OS SISTEMAS ENDOTELINÉRGICO E ENDOCANABINOIDE E SEU ENVOLVIMENTO NA SEPSE.	21
1.4 JUSTIFICATIVA	25
1.5 OBJETIVOS	26
1.5.1 Objetivo geral	26
1.5.2 Objetivos específicos.....	26
2 MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1 ANIMAIS.....	27
2.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	27
2.3 MODELO DE SEPSE	28
2.4 HIPERALGESIA PÓS-SEPSE	28
2.5 PROCEDIMENTO DE CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO.....	29
2.6 EXPERIMENTOS	30
2.6.1 Experimento 1: Generalização da memória de medo e hiperalgesia mecânica nos sobreviventes da sepse induzida por CLP.....	30
2.6.2 Experimento 2: Efeito do antagonista de receptor ET _A na taxa de sobrevivência, hiperalgesia mecânica e generalização da memória de medo nos sobreviventes da sepse induzida por CLP	31
2.6.3 Experimento 3: Efeito do antagonista de receptores CB ₁ e CB ₂ na taxa de sobrevivência, hiperalgesia mecânica e generalização da memória de medo nos sobreviventes da sepse induzida por CLP	31
2.6.4 Experimento 4: Efeito do inibidor de micróglia minociclina na taxa de sobrevivência, hiperalgesia mecânica e generalização da memória de medo nos sobreviventes da sepse induzida por CLP	31
2.6.5 Experimento 5: Efeito agudo do bloqueio dos sistemas endotelinérgico, endocanabinoide ou da inibição da micróglia sobre a neuroinflamação decorrente da sepse induzida por CLP	32
2.7 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ARC POR WESTERN BLOTTING	32
2.8 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE TNF- α POR MÉTODO ELISA.....	33

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
3 RESULTADOS.....	35
3.1 EXPERIMENTO 1	35
3.2 EXPERIMENTO 2	38
3.3 EXPERIMENTO 3	40
3.3.1 Bloqueio CB1 reverte a taxa de mortalidade e generalização da memória de medo associadas a sepse induzida por CLP.....	40
3.3.2 Bloqueio CB ₂ reverte a generalização da memória de medo tardia após sepse induzida por CLP	42
3.4 EXPERIMENTO 4	44
3.5 EXPERIMENTO 5	46
3.6 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ARC	48
4 DISCUSSÃO	49
4.1 FACILITAÇÃO DA GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO PÓS-SEPSE	49
4.2 HIPERALGESIA PÓS-SEPSE	50
4.3 O SISTEMA ENDOTELINÉRGICO NA SEPSE	51
4.4 O SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA SEPSE	53
4.5 A NEUROINFLAMAÇÃO NA SEPSE	56
5 CONCLUSÃO	59
6 REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 O TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

O transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) é uma doença multifatorial e complexa e, segundo o manual diagnóstico e estatístico de doenças mentais (DSM-5; *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 2013), é definido como uma doença relacionada à exposição de indivíduos a situações traumáticas que envolvem risco de morte. Conseqüentemente, esses indivíduos apresentam uma intensa reação de medo ou pânico (Yehuda et al., 2015). É uma doença usualmente vista em veteranos de guerra e vítimas da violência urbana (Watson, 2019) e sintomas comuns incluem ansiedade, depressão e reexperiência de eventos traumáticos através de *flashbacks* e pesadelos, característicos de evocações espontâneas da memória traumática (Besnard and Sahay, 2016; Czerniawski and Guzowski, 2014).

Para que uma memória, por exemplo a memória do evento traumático, seja acessada e evocada é necessário que ela passe pelas etapas de aquisição e estabilização (Dudai, 2004; Morgado-Bernal, 2011). A aquisição de uma memória ocorre quando um indivíduo se depara pela primeira vez com a experiência que gera o aprendizado. As informações chegam ao cérebro através dos órgãos sensoriais e do córtex sensorial primário. Os circuitos específicos de neurônios ativados durante a formação da memória sofrem modificações e alterações de plasticidade que sustentam a longo prazo o armazenamento de informações relacionadas ao evento original. Essas modificações requerem o envolvimento complexo e temporalmente orquestrado da amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal, além de sistemas transmissores como o sistema endocanabinoide (eCB) (McGaugh, 2000; Ratano et al., 2017).

Estas informações compreendem um padrão de ativação neuronal estabelecido na fase de aquisição e consolidado após a estabilização da memória formada. Estímulos semelhantes terão padrões semelhantes, e para que haja diferenciação entre eles a região do giro denteado do hipocampo estabelece o chamado padrão de separação da memória. Esta região é, então, responsável por estabelecer padrões de ativação neuronal que sejam diferentes para estímulos semelhantes que não idênticos (Madar et al., 2019; Santoro, 2013). O padrão de separação é uma das funções encontradas prejudicadas no TEPT e está relacionado

a generalização da memória de medo (Czerniawski and Guzowski, 2014; Lange et al., 2017).

A coordenação dos sistemas modulatórios da memória é bastante dependente do sistema eCB. As memórias não são codificadas instantaneamente, mas estabilizadas gradualmente ao longo do tempo, durante a etapa de consolidação (Dudai, 2004). Em modelos experimentais, relata-se que o período de 6 horas após a exposição a uma experiência aversiva é crítico para a formação da memória de medo, o que demonstra a importância do *timing* na modulação da memória (McGaugh, 2000). Esta “janela de tempo” é caracterizada por um período de síntese de proteínas aumentado, evidenciada pela ação de inibidores de síntese proteica em bloquear a consolidação de uma memória de medo (Igaz et al., 2002). Esta fase da formação da memória crucial na generalização, onde quanto maior a consolidação maior também a generalização da memória de medo (Gazarini et al., 2014; Stern et al., 2017). Uma das proteínas sintetizadas nestes eventos é a proteína do citoesqueleto regulada por atividade (Arc do inglês *activity-regulated cytoskeletal protein*), necessária à polimerização e estabilização do citoesqueleto na formação de novas espinhas dendríticas (Messaoudi et al., 2007; Shepherd and Bear, 2011).

Na clínica, uma observação já relatada é a de que pacientes com TEPT apresentam uma redução nos níveis de dois eCBs, a anandamida e 2-arquidonoil glicerol (2-AG) circulantes, assim como um aumento na expressão de receptores canabinoides tipo 1 (CB1) no hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala, áreas recrutadas durante o aprendizado aversivo e processamento da memória (Hauer et al., 2013; Neumeister et al., 2013). As causas desse desequilíbrio na transmissão eCB ainda permanecem por serem investigadas.

Tem sido relatado também que após períodos de internação em unidades de tratamento intensivo e múltiplas cirurgias, entre 3 a 6 meses após terem sobrevivido, aproximadamente 28 % dos pacientes desenvolvem o TEPT, mas que para determinados grupos (i.e. homens acima de 40 anos) o risco e a incidência pode ser ainda maior (Boer et al., 2008). Como existe o consenso de que o desenvolvimento do TEPT requer o enfrentamento de uma experiência traumática e, portanto, a formação da memória frente a esse evento, um desequilíbrio no processamento dessa memória seria um dos fatores etiológicos e as etapas de formação da memória importantes no desenvolvimento do TEPT (Yehuda et al., 2015).

A incidência de TEPT em pacientes sobreviventes de sepse ainda não tem uma causalidade testada, apesar da literatura ser rica em relatos dos efeitos deletérios sobre a cognição que procedimentos cirúrgicos podem ter (Safavynia and Goldstein, 2018). Dados sobre a epidemiologia da sepse são limitados, mas Fleischmann e colaboradores (2016) estimaram que cerca de 50 milhões de casos de sepse são tratados por ano em unidades hospitalares em todo o mundo, os quais geram em torno de 5,3 milhões de mortes decorrentes da sepse anualmente (Fleischmann et al., 2016). Uma outra perspectiva desta questão é pelo menos 45 milhões de pacientes sobreviverão a sepse, e isso virá com um custo e este custo pode incluir o TEPT.

A neuroinflamação é uma condição também atribuída a sepse e, frequentemente, é uma hipótese para essas alterações comportamentais, além de poder fundamentar alguns dos efeitos cognitivos de longo prazo (Barichello et al., 2019; Czerniawski and Guzowski, 2014; Granger et al., 2013).

1.2 A SEPSE COMO EVENTO TRAUMÁTICO

A sepse é uma doença complexa associada com uma desregulação da resposta do hospedeiro a uma infecção. Falência múltipla de órgãos e alta taxa de mortalidade são os aspectos mais evidentes desta condição. À este respeito, o termo sepse tem diferentes concepções e foi recentemente atualizado, onde, após extensiva revisão da literatura, Singer e colaboradores (Singer et al., 2016) publicaram um consenso na terminologia associada a sepse, com o intuito de esclarecer e tornar mais objetivo o diagnóstico e, assim, as condutas acerca da sepse.

O gatilho inicial para a sepse é uma infecção que chega à circulação sanguínea e, dessa maneira, induz uma resposta inflamatória sistêmica que causa danos aos órgãos do próprio paciente. Hipotensão, hipotermia e resposta diminuída a vasoconstritores também são vistos (Singer et al., 2016), parâmetros estes que comumente eram associados a uma síndrome da resposta imune sistêmica (*SIRS*). Também, como observado na Figura 1, a sepse era usualmente colocada em um gradiente, de acordo com a evolução da doença partindo da infecção até o choque séptico. A identificação da *SIRS* bem como de um possível estágio mais severo da doença traziam ônus ao diagnóstico e, assim, alguns pacientes sépticos não eram diagnosticados, prejudicando o tratamento (Napolitano, 2018).

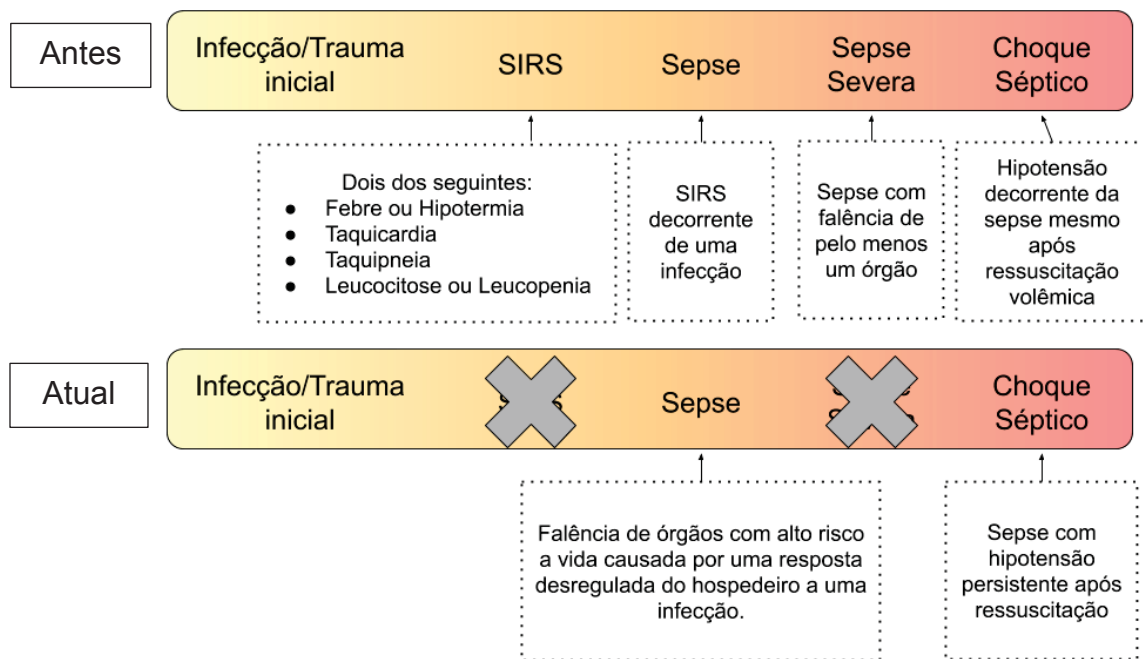


Figura 1 – Sepsis: Gradiente de definição da doença

Definições da sepsis antes e após o consenso Sepsis-3, de Singer e colaboradores, consenso atual. Abandonou-se a correlação entre uma síndrome da resposta imune sistêmica (SIRS) e a infecção para o diagnóstico da sepsis e, também, a classificação desta como “severa”, que implicava na existência de uma categoria de menor severidade. Assim, focando-se em parâmetros mais objetivos e claros, ganha-se tempo no diagnóstico e tratamento da doença.

FONTE: O autor, adaptado de Napolitano (2018).

Então, no consenso *Sepsis-3* estabeleceu-se que dois pontos no escore de avaliação de falência de órgãos sequencial (SOFA, do inglês *sequential organ failure assessment*) junto de qualquer indicativo de infecção já caracteriza sepsis. Daí vem a definição da sepsis como: uma falência de órgãos com alto risco a vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção. Partindo desta, define-se o choque séptico como uma sepsis cuja hipotensão não é reversível mesmo após administração de drogas vasoativas e ressuscitação volêmica (Singer et al., 2016).

Muitos dos componentes da resposta imune que são normalmente próprios da defesa do hospedeiro contra infecção, na sepsis são responsáveis por causar dano tecidual e falência múltipla de órgãos (Cohen, 2002). A infecção com a presença de toxinas bacterianas (e.g. o lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias gram-negativas ou como exotoxina de gram-positivas) ativa macrófagos teciduais e promove uma larga migração de células efetoras através da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Algumas destas, como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina (IL)-1 β (revisado em Cohen, 2002; Kowalczyk et al., 2015) encontram-

se certamente, elevadas na sepse (Cannon et al., 1990; Ma et al., 2016; McKenna et al., 2015) e medeiam mecanismos parácrinos resultando na migração de células efetoras para a região do foco da infecção, conforme se observa experimentalmente na presença de grande quantidade de leucócitos no exsudato peritoneal após CLP (Leite-Avalca et al., 2016).

O acesso massivo de citocinas pró-inflamatórias a corrente sanguínea causa uma indução na atividade da óxido nítrico sintase, enzima responsável pela produção de óxido nítrico (NO) no tecido vascular, com consequente elevação também deste mediador (Schulte et al., 2013). O NO é importante no combate a infecção, mas, na sepse, contribui para uma piora no prognóstico ao causar vasodilatação periférica e redução do fluxo sanguíneo glomerular, resultando em uma queda acentuada da pressão arterial, redução do débito cardíaco por inotropismo negativo, além de edema e hipoperfusão tecidual. Estes eventos culminam, então, na falência de órgãos, marco clínico central da sepse (Cohen, 2002; De Cruz et al., 2009). Este aumento nos níveis de vasodilatadores combinado com uma redução da resposta dos vasos a vasoconstritores como noradrenalina e arginina vasopressina (AVP) acentua a gravidade da falência de múltiplos órgãos (Singer et al., 2016).

Dentre estes mediadores, TNF- α e IL-1 β também podem mediar mudanças cognitivas e comportamentais duradouras e, em determinadas condições experimentais, a interferência com a ação do TNF- α reduz o efeito do trauma na formação da memória contextual (Terrando et al., 2010).

O sistema nervoso central é particularmente vulnerável ao dano em resposta à inflamação sistêmica e na sepse tem o agravante da diminuição do fluxo sanguíneo e aporte de nutrientes em função dos efeitos do NO (De Cruz et al., 2009). Também, a infiltração de células imunes, ativação de células da micróglia e liberação de mediadores no sistema nervoso central pode levar a mudanças funcionais e estruturais profundas que incluem déficit de memória, delírio associado à sepse e declínio cognitivo. Estas mudanças funcionais podem ser decorrentes de mudanças até mesmo morfológicas uma vez que o número de neurônios no hipocampo é reduzido e as mitocôndrias tornam-se disfuncionais, entre outros efeitos (para revisão ver Sankowski et al., 2015). Algumas citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-1 β , altamente liberadas na sepse, podem diretamente causar mudanças cognitivas duradouras. Além disso, a interferência com a ação do TNF- α reduz o efeito do trauma na formação da memória contextual (Terrando et al., 2010)

Em relação a isso, danos cognitivos e perda de capacidades funcionais após hospitalizações por sepse já são bem documentados e estima-se que o paciente sobrevivente de sepse tem até três vezes maior risco de apresentar algum declínio cognitivo duradouro (Iwashyna et al., 2010). Alguns destes efeitos observáveis são relacionados a memória e, neste sentido, Boer e colaboradores (2008) reportaram que até 80 % dos pacientes que passaram por UTIs, internados por sepse decorrente de uma peritonite, desenvolvem sintomas do TEPT (Boer et al., 2008). No entanto não há estudos que correlacionem diretamente sepse e ocorrência de TEPT

Em se tratando modelos para o estudo da sepse, a ligação e punção do ceco (CLP) em ratos ou camundongos é atualmente considerada o padrão ouro para o estudo da doença. Através de um procedimento cirúrgico simples, emula-se uma peritonite que rapidamente evolui à sepse (Ruiz et al., 2016). Utilizando este modelo experimental, temos estudado e evidenciado um papel importante de dois importantes sistemas, sistema endotelinérgico e o sistema endocanabinoide, no SNC para a sobrevivência na sepse (Leite-Avalca et al., 2016, 2019; Leite-Avalca, 2018).

Para a maior compreensão deste papel passaremos a descrever estes sistemas e o seu envolvimento na sepse.

1.3 OS SISTEMAS ENDOTELINÉRGICO E ENDOCANABINOIDE E SEU ENVOLVIMENTO NA SEPSE.

As endotelinas (ET) são os sinalizadores do sistema endotelinérgico, consistindo de três isoformas (ET-1, ET-2 e ET-3), que atuam sobre dois tipos principais de receptores endotelinérgicos, os do tipo A (ET_A) e do tipo B (ET_B) (Kowalczyk et al., 2015). Estes, são receptores acoplados a proteína G com ampla distribuição, presentes de maneira importante no músculo liso do sistema vascular onde o receptor ET_A medeia, através do aumento do cálcio intracelular, a vasoconstrição, enquanto o receptor ET_B tem papel principalmente regulador (Bouallegue et al., 2007).

ET-1 é um mediador produzido por células endoteliais em resposta, por exemplo, a citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (Maemura et al., 1992). Corroborando estes dados, os níveis séricos de ET-1 estão elevados em pacientes sépticos e correlacionam-se com a mortalidade e com dano de órgãos (Kowalczyk et al., 2015; Piechota et al., 2007). Ainda, ET-1 exerce papel neuroendócrino importante

(Rossi et al., 2008) e encontra-se elevada no SNC na sepse (Lundberg et al., 2016). Estudos anteriores demonstraram que este peptídeo está aumentado no sistema nervoso central de ratos 4 h após a indução de CLP (McCarron et al., 1993).

Em um estudo prévio, Zampronio e colaboradores (2010) demonstraram que ET-1, atuando em receptores ET_A em neurônios magnocelulares (NMC) no núcleo supraóptico do hipotálamo, causa ativação de uma cascata de sinalização retrógrada através da liberação de eCBs. Estes eCBs, por sua vez, atuando sobre receptores canabinoides tipo 1 (CB_1) reduzem as correntes excitatórias pós-sinápticas espontâneas nos NMCs, o que sugere uma inibição da liberação de AVP (Zampronio et al., 2010). Dado o envolvimento de ET-1, eCB e AVP na sepse, nós hipotetizamos que estes sistemas poderiam estar interrelacionados nesta doença.

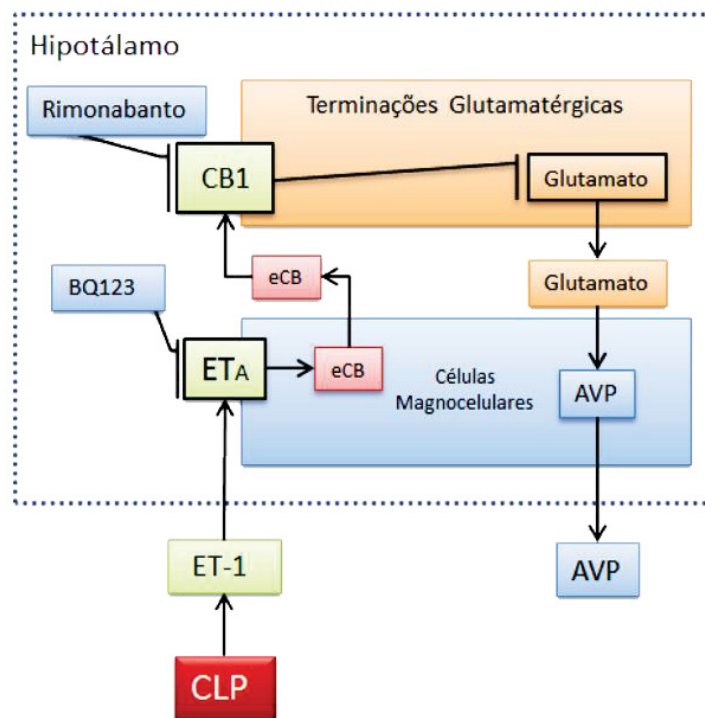


Figura 2 – Eixo endotelínico/endocanabinoide no hipotálamo

A sepse é uma das condições onde encontra-se uma elevada concentração de ET-1 plasmática. A imagem propõe um modelo de controle da liberação de AVP feito a nível hipotalâmico. Os ventos descritos seriam: A CLP (e por conseguinte a sepse) gera um aumento sistêmico de ET-1. No hipotálamo ET-1 liga-se em e ativa receptores ETA de neurônios magnocelulares que causam a sinalização inibitória retrógrada a neurônios glutamatérgicos através da liberação de endocanabinoides. Estes ligam-se em e ativam receptores CB_1 , diminuindo a neurotransmissão glutamatérgica sobre os neurônios magnocelulares causando, por fim, uma diminuição nos níveis de AVP circulantes. Ao bloquear-se os receptores ETA diminuiria-se a sinalização eCB retrógrada, diminuindo, assim, a inibição sobre a neurotransmissão glutamatérgica restaurando os níveis circulantes de AVP. Resultado semelhante é obtido com o bloqueio específico dos receptores CB_1 .

FONTE: Leite-Avalca (2018)

De fato, o bloqueio central dos receptores ET_A e CB₁ melhorou diversos desfechos associados com modelos animais para sepse. Mais especificamente, quando uma injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de um antagonista destes receptores é feita 4 h após a indução da sepse por modelo de ligação e punção do ceco (CLP), os níveis circulantes de AVP e a taxa de sobrevivência são recuperados, ainda que nenhum outro parâmetro da sepse seja alterado (e.g. carga bacteriana, infiltração leucocitária e concentração sérica de IL-6) (Leite-Avalca et al., 2016). Este mecanismo foi explorado em outro trabalho do grupo, focando-se no bloqueio do receptor CB₁ no mesmo período descrito acima. Leite-Avalca e colaboradores (2019) relataram uma melhora em parâmetros de dano tecidual (i.e. diminuição nos níveis de lactato e das enzimas lactato-desidrogenase e creatina fosfoquinase) na sepse induzida por CLP.

O sistema eCB tem um papel fundamental na regulação da neurotransmissão excitatória glutamatérgica em geral (Piomelli et al., 2000). Os dois agonistas endógenos do sistema mais bem descritos até o momento são a anandamida e o 2-AG, a concentração deste sendo até 200 vezes maior que a daquele no SNC. Quando no meio extracelular ficam suscetíveis a degradação pelas enzimas amido-hidrolase de ácidos graxos (*Fatty-Acid Amide Hydrolase*, FAAH) e lipase de monoacilglicerol (MAGL), que catalisam a clivagem em ácido araquidônico e outros subprodutos. Quando bloqueadas estas enzimas, os níveis centrais dos endocanabinoides descritos se elevam (Benito et al., 2008; Blankman et al., 2007).

Os dois receptores da canabinoides já caracterizados, CB₁ e CB₂, são acoplados a proteína G, e o primeiro é considerado o mais abundante deste tipo no SNC, presente em regiões como hipotálamo, gânglios da base, amígdala, neocórtex, hipocampo, cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal (Herkenham et al., 1990). Os eCB são liberados por neurônios pós-sinápticos e agem no receptor CB₁ de neurônios pré-sinápticos. O resultado dessa ligação é uma redução da liberação de outros neurotransmissores, como o ácido gama-aminobutírico e o glutamato (Freund et al., 2003; Hashimoto et al., 2007). A ligação dos eCBs aos receptores CB₁ desencadeiam uma resposta intracelular característica dos acoplados a proteína G inibitória. Externamente ao sistema nervoso central, os eCB são produzidos sob demanda e agem em células localizadas perto do seu local de síntese. Por exemplo, são formados por leucócitos e plaquetas circulantes, e induzem relaxamento vascular

por interagir com receptores CB₁ na superfície vizinha do endotélio e musculatura lisa vascular (Zou and Kumar, 2018).

O sistema eCB parece estar implicado tanto com os mecanismos de formação da memória (da Silva et al., 2016; Lisboa et al., 2019; Stern et al., 2017) como com a neuroinflamação, sendo ambos receptores CB₁ e CB₂ fortemente ativados nesta condição (Hillard, 2018). Diversos relatos na literatura demonstram o papel do receptor CB₂ na neuroinflamação, com sua expressão estando aumentada em diversas condições experimentais (Mukhopadhyay et al., 2006) e clínicas bem como mediando desfechos positivos na dor e na inflamação (Benito et al., 2008; Rom and Persidsky, 2013; Samson et al., 2003).

1.4 JUSTIFICATIVA

Estudos clínicos demonstram que uma parcela dos pacientes que sobrevivem a um quadro de sepse, após um período, desenvolvem TEPT. Curiosamente, pacientes com TEPT apresentam uma importante alteração na transmissão endocanabinoide. Foi demonstrado que os eCB são liberados em grande quantidade no início da sepse experimental e que tem uma importante participação no seu desenvolvimento uma vez que animais tratados com antagonistas de receptores CB₁ apresentam uma sobrevida maior. Nossa hipótese é de que a ativação intensa do sistema eCB durante o episódio de sepse possa promover alterações neste sistema que poderiam contribuir para a instalação dos processos de formação do TEPT nos sobreviventes. No caso da sobrevida, esta intensa ativação do sistema endocanabinoide parece estar relacionada aos altos níveis de ET-1. Assim, também é possível que este peptídeo também esteja envolvido no desenvolvimento desta resposta de generalização do medo ao contexto decorrente da sepse se ela ocorrer.

O entendimento destes processos poderá auxiliar no estabelecimento de melhores estratégias terapêuticas tanto para o tratamento da sepse quanto para as possíveis comorbidades que possam instalar nos sobreviventes destes processos.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a ocorrência de generalização da memória de medo, um modelo de TEPT, em animais sobreviventes de sepse experimental. Identificado este processo, avaliar se a ativação dos sistemas endotelinérgico e eCB no período inicial da sepse contribui para o estabelecimento desta condição.

1.5.2 Objetivos específicos

Avaliar a taxa de sobrevivência, hiperalgesia e generalização da memória de medo tardia como modelo para o TEPT decorrentes da sepse induzida por CLP de 1 e 3 furos.

Avaliar os efeitos do tratamento com o antagonista dos receptores ET_A via i.c.v. 4 h após a sepse induzida por CLP na taxa de sobrevivência, hiperalgesia, generalização da memória de medo e expressão da proteína Arc no.

Avaliar os efeitos do tratamento com o antagonista dos receptores canabinoides via i.c.v. 4 h após a sepse induzida por CLP na taxa de sobrevivência, hiperalgesia, generalização da memória de medo e expressão da proteína Arc no Hipocampo dorsal.

Avaliar os efeitos da inibição da micróglia com minociclina via i.c.v. 4 h após a sepse induzida por CLP na taxa de sobrevivência, hiperalgesia, generalização da memória de medo e expressão da proteína Arc no Hipocampo dorsal.

Avaliar os efeitos dos tratamentos utilizados neste estudo sobre a neuroinflamação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos com idade entre 2 e 3 meses, pesando entre 200 e 350 g, do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná foram usados para todos os experimentos. Os animais foram mantidos em caixas plásticas e em grupos de cinco animais por caixa com livre acesso a água e comida, ciclo claro/escuro de 12h (luz ligada às 7:00) e temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com a legislação brasileira após a aprovação do protocolo experimental pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná sob o número de registro CEUA/BIO 1019 e em concordância com as Diretrizes Brasileiras para o Uso de Animais do CONCEA.

2.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina (75mg/kg) e xilasina (15mg/kg) (Laboratório Syntec, Santana da Parnaíba, SP, Brasil) e posicionados no aparelho estereotáxico. Uma cânula guia com 15,0 mm de comprimento e 0,8mm de diâmetro externo foi colocada no ventrículo lateral direito de acordo com as coordenadas do Atlas por Paxinos e Watson (2007): AP = - 0,8 mm do bregma, L = - 1,5 mm da sutura central, DV = - 2,5 mm do crânio, com a barra incisora abaixada até - 3,3 mm. A cânula foi fixada com resina acrílica e três parafusos de ácido inoxidável e um mandril estéril foi colocado dentro da cânula de modo a prevenir a oclusão ao longo do tempo. Após a cirurgia todos os animais receberam cloridrato de oxitetraciclina (400mg/kg, intramuscular) e tiveram 7 dias para se recuperar antes de iniciar qualquer protocolo experimental.

A microinjeção i.c.v. foi realizada utilizando uma seringa Hamilton acoplada a um tubo plástico flexível e uma agulha apropriada (15,5 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro externo). No momento da aplicação o mandril foi removido, a agulha posicionada dentro da cânula guia e 2 μL de droga ou veículo foi injetado ao longo de 1 min.

2.3 MODELO DE SEPSE

A cirurgia para a realização da CLP foi feita de acordo com descrição prévia de Leite-Avalca (2016). Os animais foram anestesiados de acordo com a descrição anterior e uma laparotomia de 2cm foi feita no abdômen anterior. O ceco foi exposto e uma porção de 75 % do órgão foi parcialmente ligada com um fio não-absorvível (medida a partir da válvula ileocecal). Após, foi perfurado uma ou três vezes com uma agulha de calibre 16G, de acordo com o protocolo experimental, e, então, o órgão foi levemente premido, permitindo a extrusão de uma quantidade de conteúdo intestinal através dos furos antes de ser devolvido a cavidade peritoneal. A incisão foi então fechada em camadas usando fio reabsorvível e nylon. Os animais falso-operados (Sham) passaram pelo mesmo procedimento, porém sem a ligação e perfuração do ceco. Todos os animais receberam 3 mL de solução salina subcutânea após a cirurgia.

2.4 HIPERALGESIA PÓS-SEPSE

Uma vez que o protocolo de CMC envolve a aplicação de choques elétricos na pata dos animais, avaliamos a hiperalgesia mecânica após a CLP para que, durante o período de testes daquele protocolo, esta não interferisse nos resultados. Um Anestesiômetro Eletrônico tipo Von Frey (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil) foi utilizado para avaliar o limiar mecânico de retirada de pata. Os animais foram colocados individualmente em compartimentos de plástico *plexiglass* (20 x 25 x 15 cm) sobre uma grade metálica por 60 min para ambientação. A grade metálica permitia a estimulação da região média da pata traseira usando uma ponta descartável de polipropileno (0,5 mm de diâmetro) conectada a um transdutor de força com um display digital que gravou a massa (em gramas) aplicada. A resposta de retirada da pata foi observada após aplicar força linear e crescente através do aparato e o limiar foi determinado como a média da força utilizada em três retiradas. O valor basal foi medido para todos os animais antes da CLP ou falsa cirurgia e após, em períodos específicos de acordo com cada experimento.

2.5 PROCEDIMENTO DE CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO

O protocolo utilizado para o CMC foi adaptado de estudos anteriores (da Silva et al., 2016; Stern et al., 2017). O condicionamento de medo foi realizado em uma câmara (26 x 31,5 x 21 cm; Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com paredes metálicas, uma parede frontal e tampa de acrílico transparente, designada Contexto A. O chão dessa câmara é feito de barras de metal conectadas a um gerador de choques elétricos. Uma segunda câmara (34 x 26 x 33 cm), designada Contexto B, construída inteiramente em acrílico transparente e com uma tampa preta, foi utilizada para prover pistas contextuais diferentes daquela do Contexto A. O Contexto B foi utilizado para avaliar a generalização da memória de medo.

Para permitir uma melhor aquisição da representação contextual, uma sessão de familiarização foi feita em todos os experimentos 10 dias após a CLP. Cada animal foi colocado no Contexto A e foi permitido que explorasse livremente sem estímulo externo ou choques por 3 min, antes de ser devolvido a gaiola.

A sessão de condicionamento foi feita 24 h depois. Cada animal foi colocado individualmente no Contexto A e recebeu um estímulo não-condicionado (US, três choques de 0,6 mA por 3 s com 30 s de intervalo) após um intervalo de 30s e devolvidos a gaiola. A intensidade do choque de 0,6 mA foi escolhida baseada em relatos anteriores onde a mesma não foi capaz de induzir a expressão de memória de medo generalizada (da Silva et al., 2016). A adaptação do modelo foi a remoção da sessão de Reativação no dia seguinte a de Condicionamento, onde procedemos, então, diretamente desta para as sessões-teste, de modo a diminuir o tempo de exposição dos animais ao estresse do protocolo experimental.

Foi medido o comportamento de congelamento (ausência total de movimentos do corpo e da cabeça, exceto os de respiração), definido por Blanchard e Blanchard (1969), como índice da memória de medo. Todas as sessões-teste foram gravadas em vídeo e o tempo que os animais passaram expressando o comportamento de congelamento foi quantificado por um observador treinado cego ao grupo experimental utilizando um cronômetro digital. Este tempo foi, então, registrado como porcentagem relativa ao tempo em cada uma das sessões-teste de 3 min.

Uma sessão-teste no Contexto A, denominada Teste A1, foi realizada no dia seguinte a sessão de condicionamento. Tratou-se de reexposição do animal ao Contexto A por 3 min sem o US. Todos os animais passaram por essa sessão e

aqueles que não apresentaram um tempo de congelamento superior a 50% do tempo total de exposição (pelo menos 90 segundos de congelamento em 180 s de exposição) foram removidos do estudo.

Como o objetivo foi avaliar a generalização da memória de medo, é fundamental que neste primeiro momento os animais expressem alguma memória de medo, portanto este parâmetro de exclusão foi utilizado para que somente aqueles que tinham a expressão da memória de medo fossem mantidos e avaliados nos experimentos seguintes. Os animais removidos nesta etapa do estudo foram utilizados para avaliar o sítio da injeção i.c.v.

A avaliação dos efeitos dos tratamentos ou da sepse não-tratada na generalização da memória foi feita através da exposição do animal a um contexto novo, neutro, não-pareado a nenhum US, o Contexto B. A sessão foi idêntica a outra em todos os outros aspectos e foi denominada Teste B1, realizado 24h após o Teste A1.

Para avaliar possíveis efeitos tardios, uma semana após, ambas as sessões-teste foram repetidas e denominadas, respectivamente, Teste A2 e Teste B2.

2.6 EXPERIMENTOS

Para cada experimento o desenho experimental está representado em forma de diagrama acima das figuras. Todos os animais submetidos ao protocolo completo de CMC foram eutanasiados 90min após o teste B2 para coleta do hipocampo dorsal e análises posteriores.

2.6.1 Experimento 1: Generalização da memória de medo e hiperalgesia mecânica nos sobreviventes da sepse induzida por CLP

Os animais foram submetidos a CLP ou falsa-cirurgia e foram separados nos seguintes grupos: Sham (sem perfurações nem ligação no ceco), CLP1 (ligação e uma perfuração no ceco) e CLP3 (ligação e três perfurações no ceco). Não foram realizados nenhum tipo de tratamento neste experimento. A hiperalgesia mecânica dos sobreviventes foi medida no dia seguinte após a cirurgia e todos os dias até o oitavo. No décimo dia após a CLP o protocolo de CMC foi iniciado conforme descrição prévia.

2.6.2 Experimento 2: Efeito do antagonista de receptor ET_A na taxa de sobrevivência, hiperalgesia mecânica e generalização da memória de medo nos sobreviventes da sepse induzida por CLP

Para avaliar o efeito do bloqueio de receptores ET_A durante os períodos iniciais da sepse nos parâmetros testados, o antagonista de receptores ET_A BQ123 (100 pmol, 2 µL, i.c.v.) ou o mesmo volume de solução salina estéril (veículo, i.c.v.) foi injetado 4 h após CLP ou falsa cirurgia. A dose e o tempo da administração de BQ123 foram baseados em estudos prévios (Leite-Avalca et al., 2016). O limiar mecânico foi avaliado dois e oito dias após a cirurgia. No décimo dia o protocolo de CMC foi iniciado e realizado como descrito anteriormente.

2.6.3 Experimento 3: Efeito do antagonista de receptores CB₁ e CB₂ na taxa de sobrevivência, hiperalgesia mecânica e generalização da memória de medo nos sobreviventes da sepse induzida por CLP

Para avaliar o efeito do bloqueio de receptores CB₁ e CB₂ durante os períodos iniciais da sepse nos parâmetros testados, os antagonistas de receptores CB₁ AM251 (9 mmol, 2 µL, i.c.v.) (Limebeer et al., 2010) ou CB₂ AM630 (9 mmol, 2 µL, i.c.v.) (Pacheco et al., 2009) ou o mesmo volume de solução salina estéril (veículo, i.c.v.) foram injetados 4 h após CLP ou falsa cirurgia. O limiar mecânico foi avaliado dois e oito dias após a cirurgia. No décimo dia o protocolo de CMC foi iniciado e realizado como descrito anteriormente.

2.6.4 Experimento 4: Efeito do inibidor de micróglia minociclina na taxa de sobrevivência, hiperalgesia mecânica e generalização da memória de medo nos sobreviventes da sepse induzida por CLP

Para avaliar o efeito da neuroinflamação durante os períodos iniciais da sepse nos parâmetros testados o inibidor de micróglia, minociclina (350 nmol, 2 µL, i.c.v.) (Habibi-Asl et al., 2009) ou o mesmo volume de solução salina estéril (veículo, i.c.v.) foram injetados 4 h após CLP ou falsa cirurgia. O limiar mecânico foi avaliado dois e

oito dias após a cirurgia. No décimo dia o protocolo de CMC foi iniciado e realizado como descrito anteriormente.

2.6.5 Experimento 5: Efeito agudo do bloqueio dos sistemas endotelinérgico, endocanabinoide ou da inibição da micróglia sobre a neuroinflamação decorrente da sepse induzida por CLP

Para avaliar os efeitos do bloqueio dos receptores ET_A, CB₁, CB₂ ou inibição da micróglia, os antagonistas BQ123, AM251, AM630 ou Minociclina foram injetados via i.c.v. 4 h após a CLP ou falsa cirurgia. Após 8 h da cirurgia os animais foram eutanasiados para coleta da região do hipocampo utilizada nas análises por ELISA para avaliação da neuroinflamação. O tempo de injeção bem como o tempo de coleta para dosagem do marcador de neuroinflamação foram escolhidos baseados no trabalho prévio de Leite-Avalca (2019).

2.7 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ARC POR WESTERN BLOTTING

As amostras de hipocampo dorsal extraídas 90 min após o Teste B2 foram homogeneizadas em tampão para extração de proteínas (EDTA 10 mM, Tris 100 mM pH 7,5, 0,2% de coquetel inibidor de protease (PROMEGA)). Foram adicionadas de 60 µL de Triton X-100 10%, resfriadas por 30 min e centrifugadas a 13000 rpm por 20 min a 4 °C. A 400 µL de sobrenadante foram adicionados 100 µL de tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50%, SDS 10%, dithiothreitol (DTT) 100 mM) e depois aquecidas em água fervente por 5 minutos antes de serem estocadas a -20° C. A dosagem da concentração de proteínas totais foi determinada colorimetricamente (Quick-Bradford Protein Assay, BIO-RAD).

Para eletroforese, o volume equivalente a 100 µg de proteínas das amostras foi aplicado em gel SDS-PAGE com padrão de peso molecular para referência (Kaleidoscope Prestained Standards, BIO-RAD) A separação de proteínas ocorreu a 40 V nos primeiros 30 minutos e a 120 V até o final. Após, foi utilizado o método de transferência úmida a 100 V para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, GE Healthcare Life Sciences)

Para minimizar a ligação de anticorpos não-específicos foi feito o bloqueio das membranas utilizando solução basal (Tris 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM e Tween® 20

0,025%, utilizada para todas as lavagens seriadas posteriores) com Albumina de Soro Bovino (BSA) a 3% por 2 h sob agitação e resfriamento. Após lavagens seriadas foi feita a incubação overnight com anticorpo primário anti-Arc (sc-17839 - Santa Cruz Biotechnologies, EUA) diluído em solução basal e BSA 3 % a 1:500 e, após, mais lavagens seriadas antes da incubação com anticorpo secundário anti-camundongo (1:5000; sc-516102 - Santa Cruz Biotechnologies, EUA) por 1 h.

A revelação foi feita com reagente quimioluminescente (Westen ECL Substrate, BIO-RAD) em fotodocumentador (Amersham™ Imager 600, GE Healthcare Life Sciences).

A técnica de *stripping* foi realizada remover os anticorpos ligados previamente e permitir a marcação do GAPDH para normalização e análise quantitativa. A membrana foi incubada em uma solução de *stripping* (β -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris 62,5 mM pH 6,7) a 48 °C por 30 minutos. Repetiu-se as etapas de bloqueio, incubação e revelação conforme descrição anterior mas utilizando o anticorpo primário anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnologies, USA).

Foi então feita análise quantitativa por densitometria com o software Scion Image Beta 4.03 (Scion Corporation, EUA). As intensidades foram normalizadas em comparação com os valores de expressão de GAPDH do grupo Sham.

2.8 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE TNF- α POR MÉTODO ELISA

As amostras de todas as porções do hipocampo foram removidas dos animais eutanasiados por decapitação 8 h após CLP ou falsa cirurgia (4 h após tratamento) e congeladas imediatamente em gelo seco para análise em 24 h. Após, foram homogeneizadas em tampão de lise celular ([composição] 600 μ L) e resfriados por 30 min antes de serem centrifugadas a 13000 rpm por 40 min. Foi recolhido 500 μ L de sobrenadante, submetido a dosagem de proteínas idêntica à usada no protocolo de Western Blotting.

A quantificação da presença de TNF α foi feita usando kit ELISA para TNF- α em ratos (BOSTER) e protocolo do fabricante. Os valores obtidos foram expressos em massa de TNF- α por massa de proteínas no tecido (pg/mg).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.). A taxa de sobrevivência foi expressa como uma curva de Kaplan-Meier e os grupos que passaram pela CLP foram submetidos ao teste de log-rank. O limiar mecânico de retirada de pata, bem como as porcentagens de tempo de congelamento nos testes A1 e A2, B1 e B2, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas de uma via. Quando uma significância foi encontrada, o teste pós-hoc de Newman-Keuls foi aplicado. Os valores de F para interação ou o fator contribuindo para a significância (Grupo ou Repetição) foram reportados. Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilks e nenhuma transformação foi usada neste estudo. O nível de significância foi determinado como $p < 0,05$. Para análise estatística foi utilizado o software Statistica 12 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA), e para representação gráfica o GraphPad Prism 7 (Graphpad Prism, San Diego, CA, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 EXPERIMENTO 1

Os resultados para o Experimento 1 estão demonstrados na Figura 3. O grupo Sham teve 100 % de taxa de sobrevivência em todos os experimentos. O grupo CLP1 teve uma taxa de sobrevivência de 66,6 %, diferente do grupo CLP3, cuja taxa de sobrevivência foi de 31,6 % (Qui quadrado = 3.969, $p < 0,05$, Fig. 3A).

O teste de hiperalgesia apresentou significância para Interação ($F_{(18, 120)} = 3,222$, $p < 0,01$). O limiar basal dos grupos não apresentou diferença entre si. Um dia após a cirurgia todos os grupos (Sham ou CLP) apresentaram uma redução significativa no limiar mecânico comparado com seus próprios valores basais e essa redução não foi diferente entre os grupos. Contudo, o limiar mecânico do grupo Sham retornou aos níveis basais 48 h após a cirurgia e se manteve assim em todos os demais dias do experimento. O grupo CLP1 teve um limiar mecânico significativamente reduzido do dia 1 ao dia 3 após a cirurgia, com todos estes pontos diferindo de Sham. Por sua vez, o grupo CLP3 demonstrou uma redução no limiar mecânico do dia 1 ao dia 4 após a cirurgia quando comparados com Sham, sendo que no dia 4 diferiu também do grupo CLP1.

Importante destacar, cinco dias após a cirurgia o limiar mecânico de todos os animais, independentemente de terem passado ou não pela sepse, permaneceram em níveis basais. Por esta razão e de modo a evitar estresse excessivo desnecessário aos animais, em todos os experimentos subsequentes os tempos de avaliação do limiar mecânico escolhidos foram o dia 2, onde os grupos que passaram pela CLP demonstraram limiar reduzido (e não o grupo Sham) e o dia 8 após a cirurgia (no qual todos os grupos demonstram uma reversão aos níveis basais).

No décimo dia após a cirurgia todos os animais passaram pelo protocolo de CMC (Figura 3C). Todos os grupos demonstraram uma resposta semelhante no Teste A1 (décimo-segundo dia após a cirurgia). No Teste B1, que indica a generalização da memória de medo, o grupo Sham demonstrou uma porcentagem baixa de tempo de congelamento, conforme esperado. O fator Interação para o teste B2 mostrou significância ($F_{(2, 34)} = 3,4496$, $p < 0,05$). Ambos animais do grupo CLP1 e CLP3 tiveram respostas de congelamento aumentadas comparados com Sham, apesar de não haver diferença entre eles. Os re-testes, feitos uma semana após, demonstraram

uma redução na resposta de congelamento para o grupo Sham no Teste A2 mas não para os outros grupos (Repetição, $F_{(1, 34)} = 12,678$, $p < 0,01$). No teste B2 a resposta de congelamento dos animais do grupo CLP1 não foi diferente de Sham, e apenas o grupo CLP3 demonstrou significância estatística quando comparado com este grupo (valor de Interação acima).

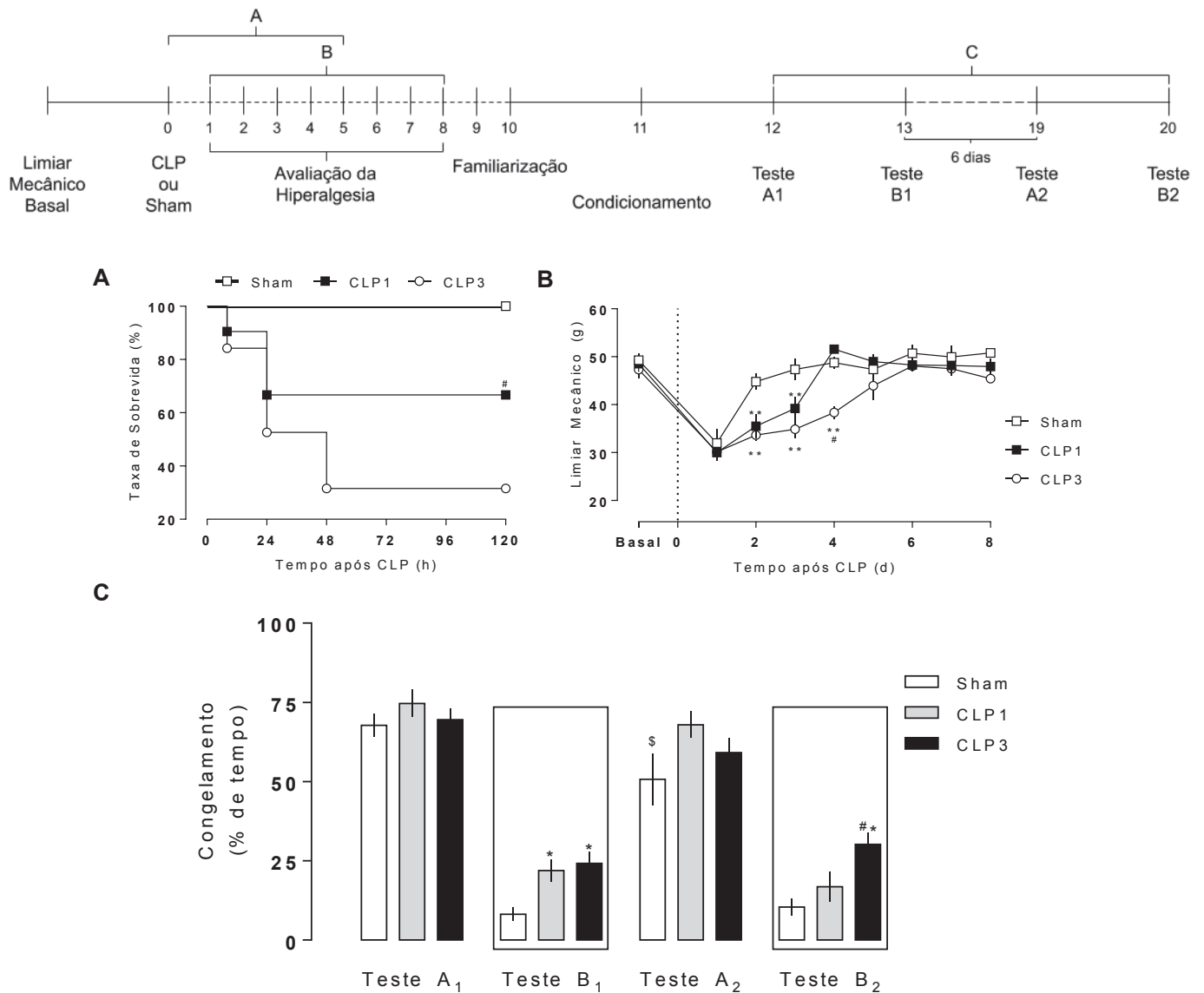


Figura 3 – Efeitos da sepse na hiperalgesia e generalização da memória

Os animais foram submetidos a falsa cirurgia (Sham) ou CLP com um (CLP1) ou três (CLP3) furos. A taxa de sobrevivência foi avaliada por cinco dias (A) e o limiar mecânico foi avaliado antes (Basal) e diariamente após a cirurgia por oito dias (B). No décimo dia o protocolo de CMC foi iniciado (C). Os dados demonstram a média \pm e.p.média da porcentagem (%) de taxa de sobrevivência, limiar mecânico (g) ou porcentagem (%) de tempo de congelamento ($n=10-12$). * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$ comparado com grupo Sham. # $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP1. \$ $p < 0,05$ comparado com o mesmo grupo no mesmo contexto.

3.2 EXPERIMENTO 2

Os resultados para o experimento 2 estão demonstrados na Figura 4. Corroborando resultados prévios do nosso grupo, a Figura 4A mostra que a CLP com três furos reduz a taxa de sobrevivência dos animais enquanto o tratamento com o antagonista de receptor ET_A , o BQ123, reduz a mortalidade dos animais a níveis semelhantes de Sham (Qui-quadrado = 6,766, $p < 0,01$). Em se tratando do limiar mecânico (Figura 4B), encontramos significância para Interação ($F_{(4, 36)} = 68,0$, $p < 0,01$), porém o tratamento com BQ123 4 h após a CLP não reduziu a hiperalgesia mecânica avaliada no dia 2 após a cirurgia. Ambos os grupos CLP apresentaram hiperalgesia mecânica quando comparados com o grupo Sham, e no oitavo dia após a cirurgia nenhuma diferença pôde ser vista, com todos os grupos retornando ao limiar semelhante ao basal.

Na Figura 4C, não foram encontradas diferenças para o teste A1. Como esperado, a CLP induziu um aumento significativo na resposta de congelamento no teste B1 quando comparado com o grupo Sham (Group $F_{(2, 17)} = 13,651$, $p < 0,01$). Também, o tratamento com BQ123 no início da sepse não foi capaz de alterar a resposta de congelamento observada no Teste B1. No teste A2 todos os grupos apresentaram uma redução na resposta de congelamento (Repetição, $F_{(1, 17)} = 47,42$, $p < 0,01$). O teste B2 replicou o que foi observado uma semana antes, onde ambos os grupos submetidos, independente do tratamento, tiveram aumento na resposta de congelamento quando comparados ao grupo Sham.

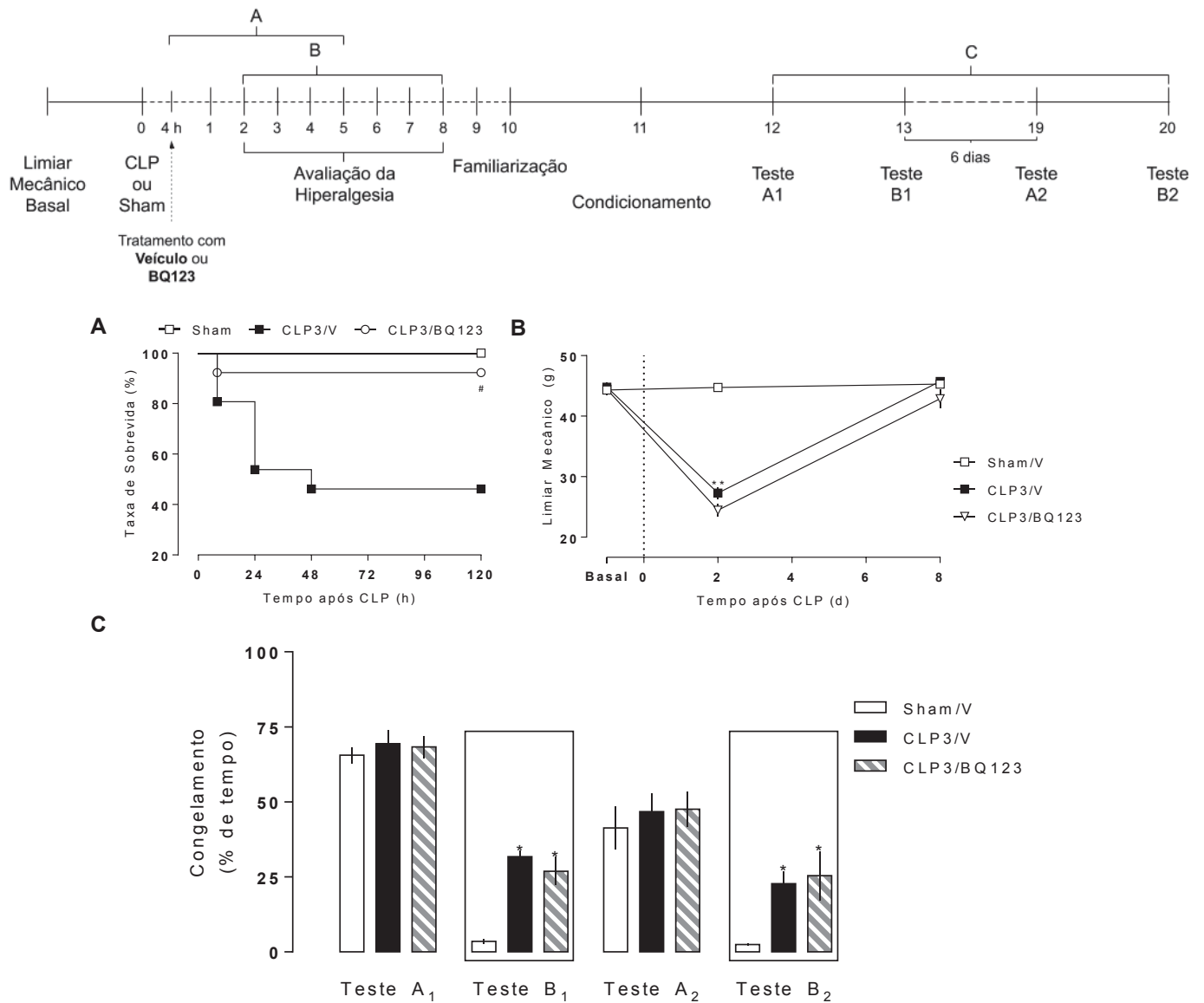


Figura 4 – Efeito do bloqueio central ET_A na sobrevida, limiar mecânico e generalização da memória de medo em animais submetidos a sepse

Os animais foram submetidos a falsa-cirurgia (Sham) ou CLP com três (CLP3) furos. Animais falso-operados e submetidos a CLP receberam veículo (V) ou o antagonista de receptor ET_A , BQ123 (100 pmol, 2 μ l, i.c.v.) 4 h após a cirurgia. A taxa de sobrevida foi avaliada por cinco dias (A) e o limiar mecânico foi avaliado antes (Basal) e diariamente após a cirurgia por oito dias (B). No décimo dia o protocolo de CMC foi iniciado (C). Os dados demonstram a média \pm e.p.média da porcentagem (%) de taxa de sobrevida, limiar mecânico (g) ou porcentagem (%) de tempo de congelamento ($n = 7-10$). * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$ comparado com grupo Sham. # $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP3/V.

3.3 EXPERIMENTO 3

Os resultados para o experimento 3 estão demonstrados nas Figuras 5 e 6.

3.3.1 Bloqueio CB1 reverte a taxa de mortalidade e generalização da memória de medo associadas a sepse induzida por CLP

O tratamento com o antagonista de receptores CB₁, AM251, ou veículo via i.c.v. foi feito 4 h após CLP ou falsa-cirurgia. A taxa de sobrevivência para os animais submetidos a CLP tratados com veículo foi em torno de 40 % e o tratamento com AM251 significativamente aumentou essa taxa a níveis próximos de Sham (Qui-quadrado = 8,758, $p < 0,01$, Figura 5A). Uma Interação significativa foi encontrada no teste de hiperalgesia mecânica ($F_{(2, 30)} = 2,3001$, $p < 0,05$). O limiar mecânico basal foi equivalente para todos os grupos antes da cirurgia e foi significativamente reduzido (hiperalgesia mecânica, portanto) no segundo dia após para ambos os grupos que passaram por CLP quando comparados a Sham (Figura 5B). Nenhuma diferença foi encontrada entre os tratamentos. O limiar mecânico de todos os grupos foi semelhante no oitavo dia após a cirurgia.

No protocolo de CMC (Figura 5C), o Teste A1 não mostrou nenhuma diferença entre os grupos, enquanto o Teste B1 mostrou uma significância para este fator (Grupo, $F_{(2, 17)} = 13,651$, $p < 0,01$). Neste teste observamos uma reiteração do resultado de que CLP induz um aumento na resposta de congelamento no protocolo de CMC, visto 13 dias após a cirurgia. O tratamento com AM251 na sepse, porém, neste caso foi capaz de reverter essa resposta tardia, onde o grupo CLP tratado com AM251 teve uma resposta de congelamento diferente daquela do grupo tratado com veículo e sem diferir de Sham. Ainda, o fator Repetição se mostrou significativo para o teste A1 e A2, onde o grupo CLP3/V foi diferente de Sham, apesar de todos os grupos terem respostas diminuídas nesse teste quando comparados com a semana anterior. O Teste B2 replicou os resultados obtidos no Teste B1, demonstrando que os efeitos do tratamento com AM251 na sepse é capaz de reverter a resposta de congelamento de uma maneira que perdura até o vigésimo dia após a sepse.

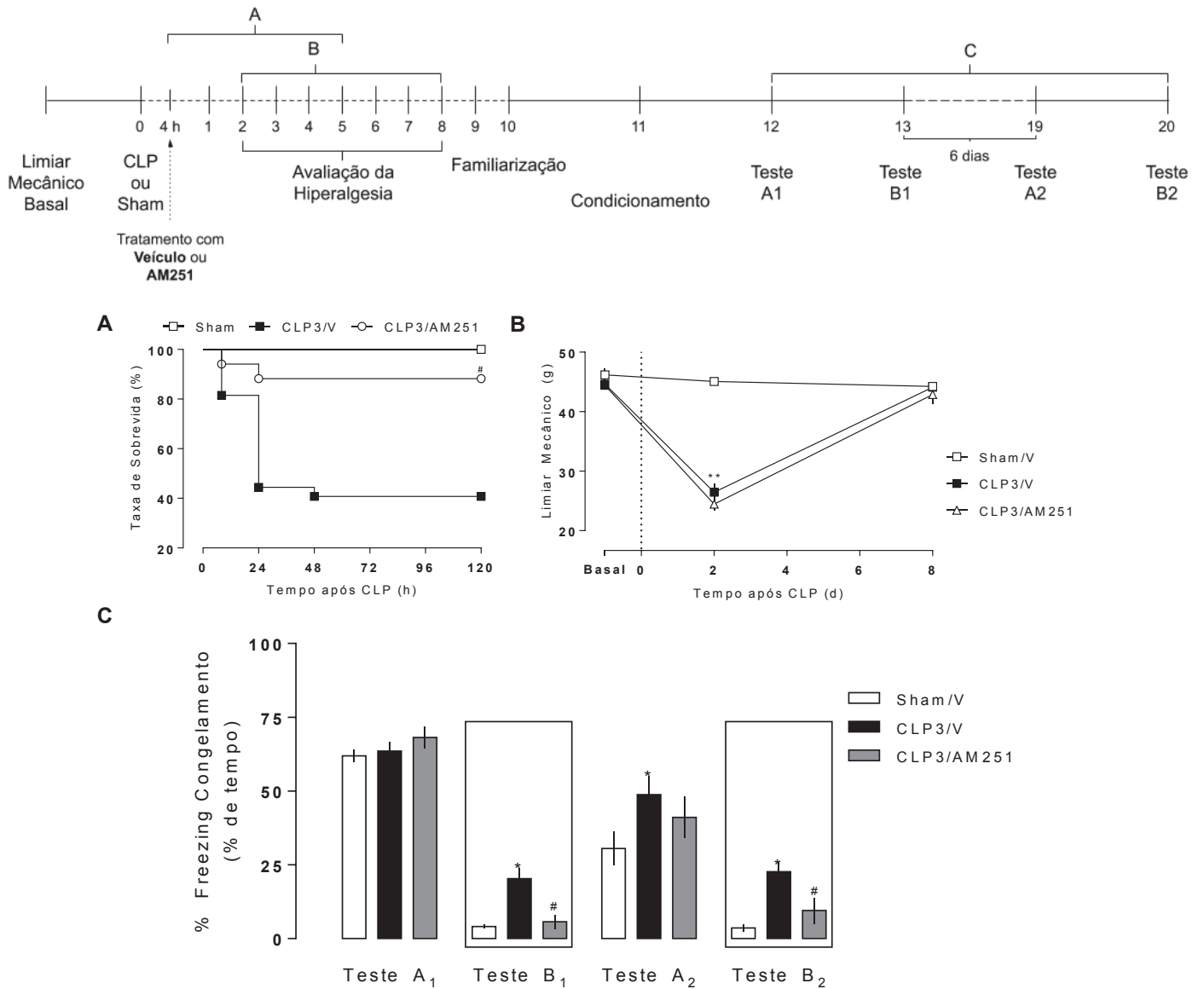


Figura 5 – Efeito do bloqueio central CB₁ na sobrevida, limiar mecânico e generalização da memória de medo em animais submetidos a sepse

Os animais foram submetidos a falsa-cirurgia (Sham) ou CLP com três (CLP3) furos. Animais falso-operados e submetidos a CLP receberam veiculo (V) ou o antagonista de receptor CB₁, AM251 (9 mmol, 2 µl, i.c.v.) 4 h após a cirurgia. A taxa de sobrevida foi avaliada por cinco dias (A) e o limiar mecânico foi avaliado antes (Basal) e diariamente após a cirurgia por oito dias (B). No décimo dia o protocolo de CMC foi iniciado (C). Os dados demonstram a média ± e.p.média da porcentagem (%) de taxa de sobrevida, limiar mecânico (g) ou porcentagem (%) de tempo de congelamento (n=7-10). * p < 0,05 ou ** p < 0,01 comparado com grupo Sham. # p < 0,05 comparado com o grupo CLP3/V.

3.3.2 Bloqueio CB₂ reverte a generalização da memória de medo tardia após sepse induzida por CLP

O envolvimento dos receptores CB₂ na sepse foi demonstrado com a utilização do tratamento i.c.v. do antagonista AM630 ou o veículo 4 h após CLP ou falsa-cirurgia (Figura 6).

O bloqueio do receptor CB₂, ao contrário daquele do receptor CB₁, não alterou a taxa de sobrevivência após a indução da CLP, uma vez que não foram observadas diferenças entre os grupos CLP3/V e CLP3/AM630 (Figura 6A Qui-quadrado = 0,205, $p = 0,6507$). Também, apesar do fator Interação ter demonstrado diferenças no teste do limiar mecânico ($F_{(4, 24)} = 13,67$, $p < 0,01$), o efeito hiperalgésico induzido pela CLP não foi modificado pelo tratamento com AM630 (Figura 6B). Ambos, limiar basal e o oitavo dia após a cirurgia não apresentaram diferenças entre os grupos.

No teste comportamental (Figura 6C), todos os grupos tiveram respostas semelhantes no Teste A1. O Teste B2 demonstrou uma diferença significativa entre os grupos (fator Grupo, $F_{(2, 24)} = 42,954$, $p < 0,01$), com um aumento na resposta de congelamento nos animais submetidos a CLP quando comparado com Sham, e esse efeito foi abolido pelo tratamento com AM630. O fator repetição para os Testes A1 e A2 foi significativa (Repetição, $F_{(1, 24)} = 32,240$, $p < 0,001$) e o grupo Sham teve uma resposta diminuída no Teste A2. O Teste B2 demonstrou números semelhantes àqueles do Teste A1, sendo, então, a reversão do aumento da generalização da memória observada no Teste B1 mantida uma semana após.

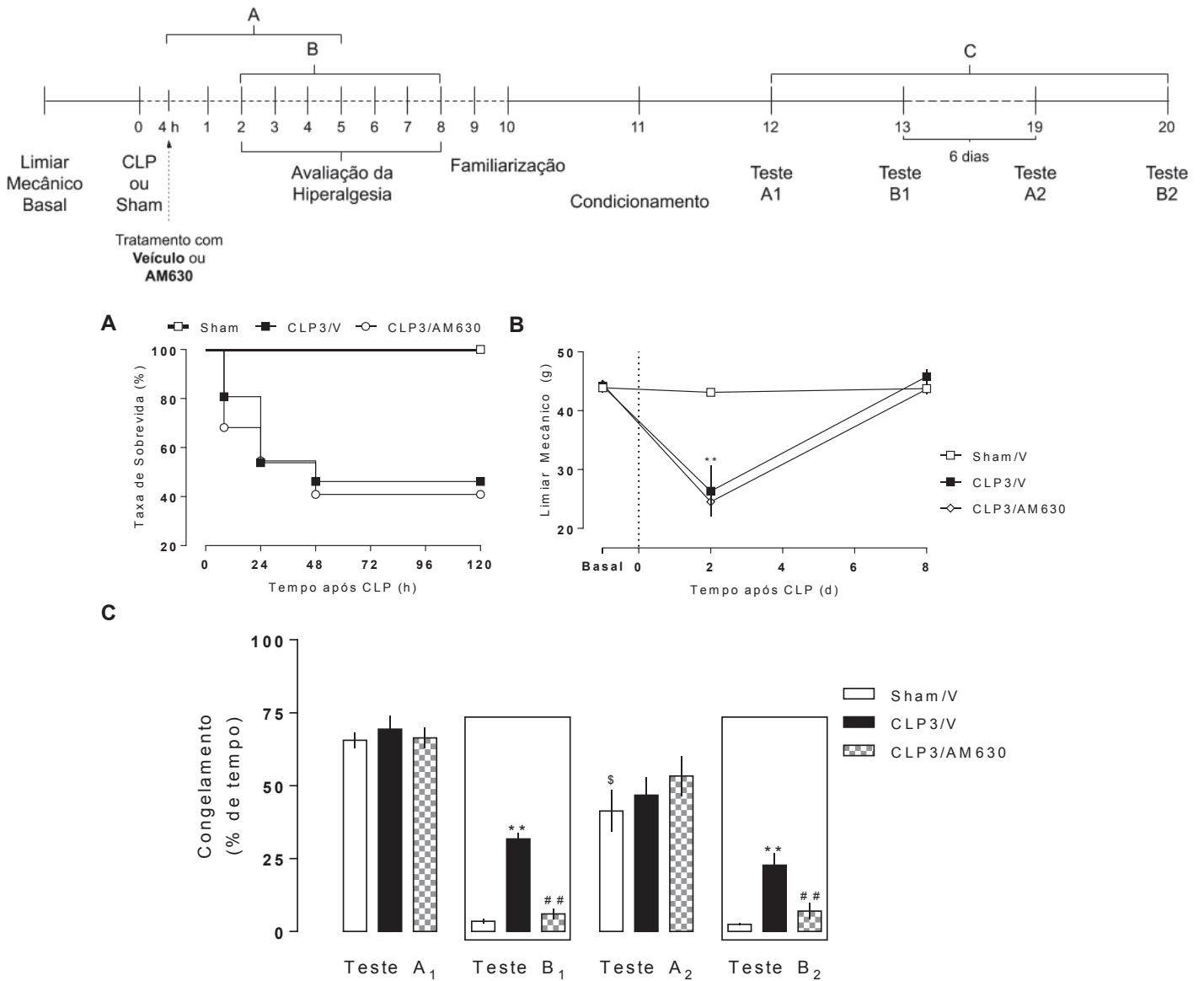


Figura 6 – Efeito do bloqueio central CB₂ na sobrevida, limiar mecânico e generalização da memória de medo em animais submetidos a sepse

Os animais foram submetidos a falsa-cirurgia (Sham) ou CLP com três (CLP3) furos. Animais falso-operados e submetidos a CLP receberam veículo (V) ou o antagonista de receptor CB₂, AM630 (9 nmoll, 2 µl, i.c.v.) 4 h após a cirurgia. A taxa de sobrevida foi avaliada por cinco dias (A) e o limiar mecânico foi avaliado antes (Basal) e diariamente após a cirurgia por oito dias (B). No décimo dia o protocolo de CMC foi iniciado (C). Os dados demonstram a média ± e.p.média da porcentagem (%) de taxa de sobrevida, limiar mecânico (g) ou porcentagem (%) de tempo de congelamento (n=7-10). . * p < 0,05 ou ** p < 0,01 comparado com grupo Sham. # p < 0,05 comparado com o grupo CLP3/V.

3.4 EXPERIMENTO 4

Na figura 7A, o tratamento com minociclina não foi capaz de reverter a taxa de sobrevida associada com CLP (Qui-quadrado = 0.9844, $p = 0.3211$), visto que ambos os grupos tiveram taxas menores que sobrevida menores que Sham. Mais uma vez, apesar do fator Interação indicar diferença entre os grupos ($F_{(4, 30)} = 57.420$, $p = 0.001$) ambos os grupos submetidos a CLP, independente do tratamento, tiveram limiar mecânico reduzido no segundo dia após a cirurgia que retornou aos níveis basais no oitavo dia (Figura 7B).

No protocolo de CMC (Figura 7C), o Teste A1 não mostrou diferenças entre os grupos. Importante, no Teste B1, o tratamento da sepse com a minociclina 4 h após a CLP reverteu a resposta de congelamento associada ao grupo tratado apenas com veículo (Grupo, $F_{(2, 29)} = 64,189$, $p = 0,001$), sendo diferentes entre si mas aquele não diferindo de Sham/V.

Os re-testes mostraram uma redução na resposta de congelamento para todos os grupos no Teste A2 em relação ao A1, enquanto a resposta vista no Teste B1 foi mantida no Teste B2, no qual CLP3/Mino diferiu de CLP3/V e não de Sham.

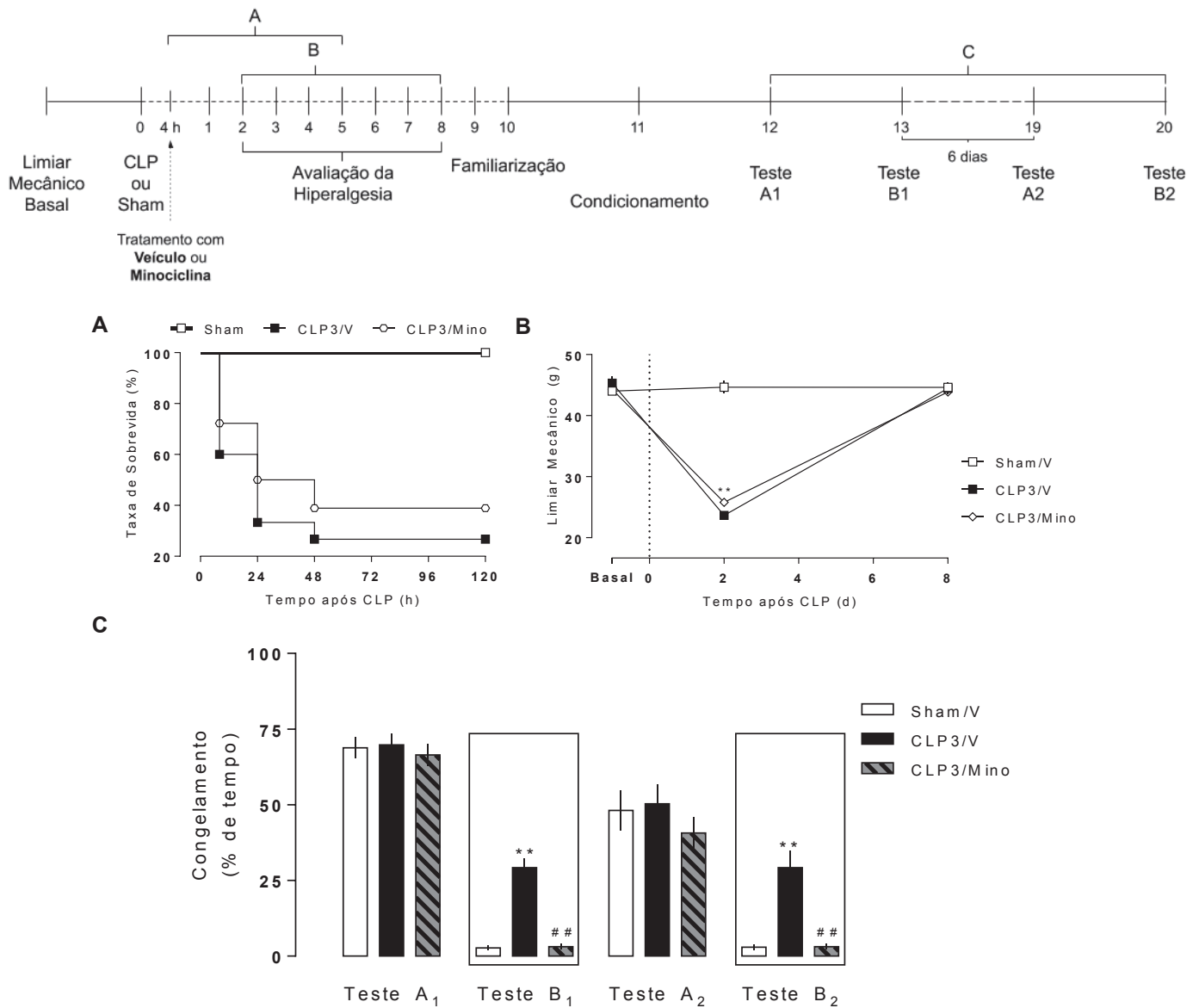


Figura 7 – Efeito da inibição da micrógliã na sobrevida, limiar mecânico e generalização da memória de medo em animais submetidos a sepse

Os animais foram submetidos a falsa-cirurgia (Sham) ou CLP com três (CLP3) furos. Animais falso-operados e submetidos a CLP receberam veículo (V) ou o inibidor de micrógliã, Minociclina (350 nmol, 2 µl, i.c.v.) 4 h após a cirurgia. A taxa de sobrevida foi avaliada por cinco dias (A) e o limiar mecânico foi avaliado antes (Basal) e diariamente após a cirurgia por oito dias (B). No décimo dia o protocolo de CMC foi iniciado (C). Os dados demonstram a média ± e.p.média da porcentagem (%) de taxa de sobrevida, limiar mecânico (g) ou porcentagem (%) de tempo de congelamento (n=10-12).). * p < 0,05 ou ** p < 0,01 comparado com grupo Sham. # p < 0,05 comparado com o grupo CLP3/V.

3.5 EXPERIMENTO 5

Os resultados para o experimento 5 estão demonstrados na Figura 8 com a dosagem de TNF α no hipocampo de animais 8 h após cirurgia. Houve uma diferença significativa entre os grupos ($F_{(5, 30)} = 8,514$, $p < 0,01$), onde podemos observar um aumento na concentração de TNF α no hipocampo de todos os animais que passaram pelo procedimento de CLP com três furos. Em relação ao grupo Sham, o grupo tratado com veículo teve um aumento de $132,40 \pm 60,43$ %. Os tratamentos com BQ123 (aumento de $117,62 \pm 38,31$ %), AM251 (aumento de $77,42 \pm 27,54$ %) e AM630 (aumento de $112,88 \pm 80,97$ %) não reverteram este aumento, diferindo significativamente de Sham e do grupo tratado com minociclina. Este foi o único que reverteu o aumento causado por CLP de três furos, cujo aumento de $10 \pm 30,88$ % não foi diferente dos valores de Sham, mas sim dos valores do grupo CLP3/V.

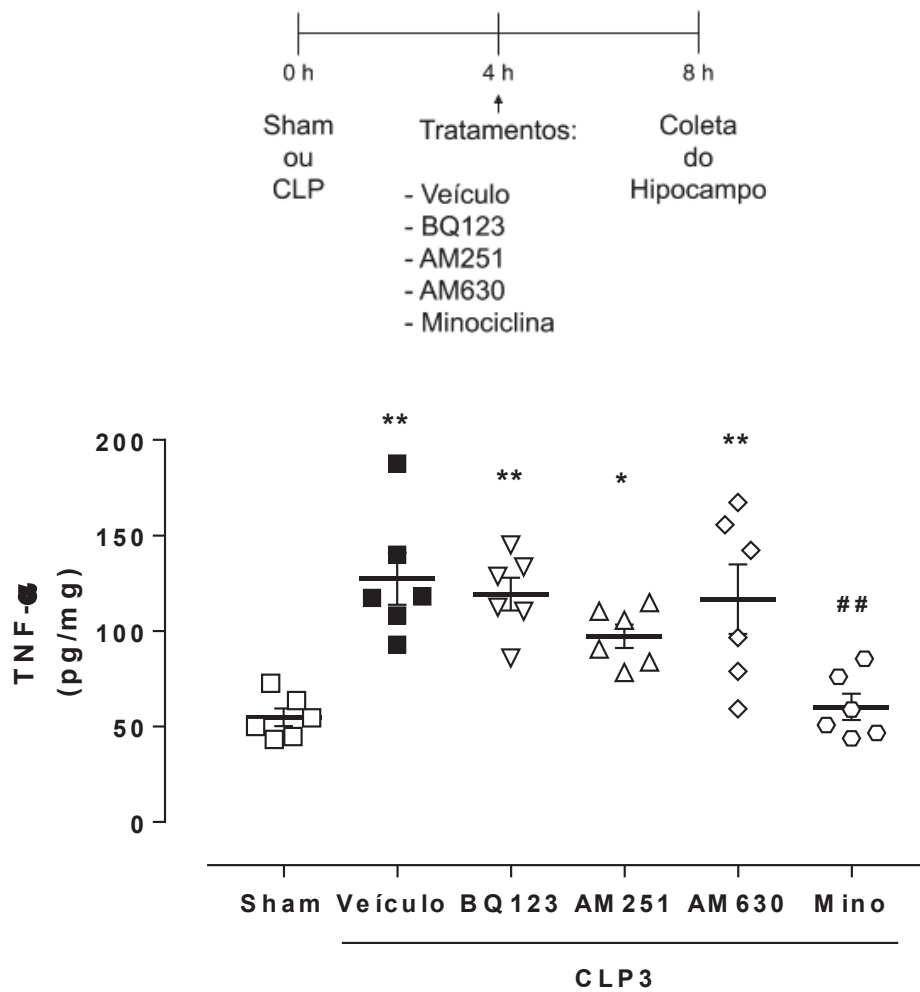


Figura 8 – Inibidor de micróglia reverte a neuroinflamação após CLP

Os animais foram submetidos a falsa-cirurgia (Sham) ou CLP com três (CLP3) furos. Animais falso-operados e submetidos a CLP receberam Veículo, BQ123, AM251, AM630 ou Minociclina (Mino) via i.c.v. 4 h após a cirurgia. 8 h após a cirurgia foram eutanasiados e seus hipocampos coletados para dosagem de TNF α . Os pontos são cada a média da duplicata de cada indivíduo e as linhas representam a média \pm e.p.média da proporção de TNF α por miligrama de proteína no tecido (pg/mg) (n=6).). * p < 0,05 ou ** p < 0,01 comparado com grupo Sham. ## p < 0,01 em relação ao grupo CLP3/V

3.6 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ARC

Os resultados para a dosagem da proteína Arc após protocolo de CMC estão demonstrados na Figura 9 através de método de Western Blot e representados em unidades arbitrárias, normalizadas para a concentração de GAPDH. Os resultados foram normalizados em relação ao grupo Sham. Não foi encontrada diferença entre os grupos ($F_{(5, 39)} = 1,0814$, $p = 0,3846$).

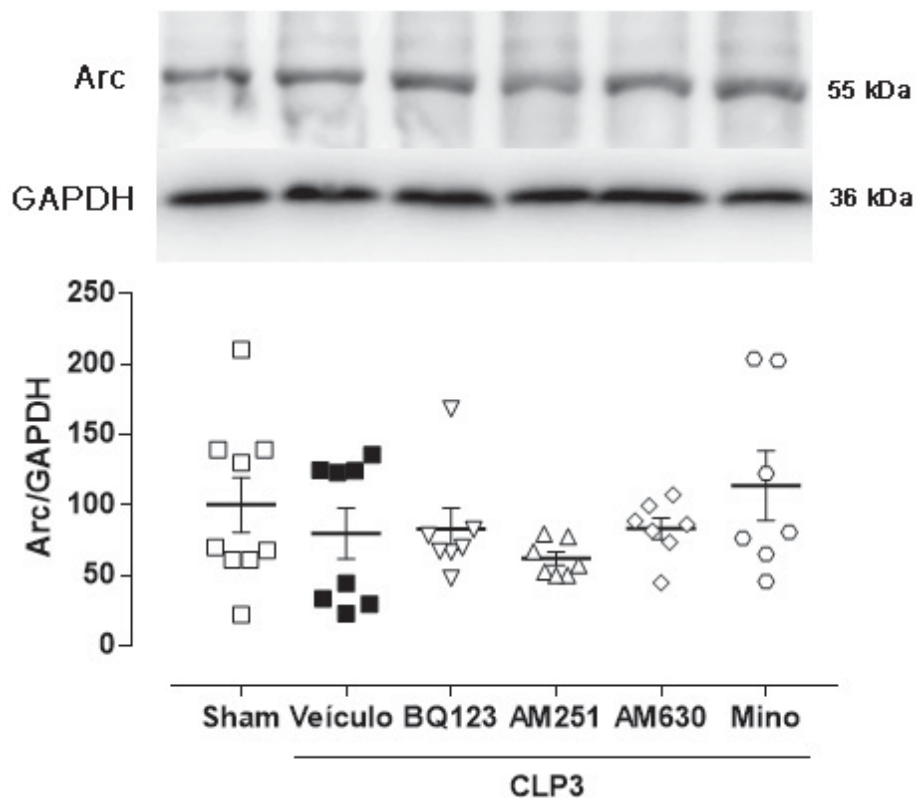


Figura 9 – Western Blot da proteína Arc no Hipocampo Dorsal 20 dias após CLP

Os animais dos experimentos 2 a 4 passaram pelo protocolo de CMC completo e 90 min após Teste B2 foram eutanasiados e a região do hipocampo dorsal foi coletada para análise de Western Blot. Os pontos são a média da duplicata de cada indivíduo e as linhas representam a média \pm e.p.média da proporção de Arc por GAPDH ($n=7-9$). ..

4 DISCUSSÃO

Evidenciamos, neste trabalho, que o bloqueio central dos receptores canabinoides e da neuroinflamação numa fase inicial da sepse pode ter efeitos prolongados profundos na saúde dos sobreviventes. Isto foi demonstrado com os experimentos de CMC, que modela parâmetros associados com o TEPT (e.g. consolidação e generalização da memória de medo).

4.1 FACILITAÇÃO DA GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO PÓS-SEPSE

O primeiro objetivo do estudo foi avaliar se a sepse induziria a generalização da memória de medo nos sobreviventes, um efeito a ser observado tardiamente. A generalização da memória de medo avaliada neste estudo é frequentemente usada como modelo para o TEPT, uma condição não estranha a sobreviventes de situações de alto risco à vida. Primeiramente, os animais que foram submetidos a CLP não mostraram diferenças na aquisição da memória, visto que porcentagens de tempo de congelamento semelhantes entre os grupos Sham e CLP (com um e três furos) foram observadas no Teste A1, resposta essa apresentada a um contexto igualmente neutro e pareado com um US idêntico a todos os grupos. Uma semana após, porém, no Teste A2 vemos uma redução significativa na resposta de congelamento apenas do grupo Sham e não dos grupos CLP. Isto demonstra que um dos efeitos duradouros vistos após a CLP é um aprimoramento da consolidação da memória de medo. Deste ponto de vista, já foi sugerido que aumentando-se a consolidação da memória de medo contribui-se para a generalização da mesma (Gazarini et al., 2014; Stern et al., 2018).

Após extensiva revisão da literatura, este é o primeiro relato destes eventos envolvendo memória de medo em animais submetidos a sepse, e consideramos um marco importante na caracterização de um dos conceitos principais neste trabalho: o cérebro do indivíduo que sobrevive a sepse não mais apresenta as mesmas características de antes do processo da doença, o que é corroborado por diversos estudos clínicos e pré-clínicos (revisado em Barichello et al., 2019). Neste sentido, um dos aspectos mais difíceis no seguimento da sepse e suas consequências se dá a alta taxa de mortalidade e um aumento na incidência correlacionado ao aumento de idade (Boer et al., 2008; Fleischmann et al., 2016). Um importante relato da literatura sobre as consequências da sepse em sobreviventes foi o trabalho publicado por

Iwashyna (2010) e colaboradores, descrevendo diversos prejuízos em funções do cotidiano e funções cognitivas (i.e. memória, orientação espacial e operações matemáticas simples). Dois aspectos denotam a importância daquele trabalho: 1) o seguimento dos pacientes antes e após o diagnóstico da sepse e 2) a comparação com pacientes em hospitalizações equiparáveis, mas não-sépticos. De fato, os pacientes hospitalizados por sepse, um a três anos após alta hospitalar, apresentaram uma perda significativa importante das funções descritas.

Hipotetizamos que parte da “cicatriz” que a sepse deixa no cérebro dos sobreviventes tem relação com alterações na função de plasticidade neural. A capacidade de sintetizar proteínas, um processo altamente organizado dependente de diversos sistemas, é fundamental para a formação e modulação de memórias. Um marcador para a plasticidade neural é a medição da concentração da proteína Arc, importante para a consolidação e estabilização da memória, funcionalmente relacionada com a manutenção do citoesqueleto nas sinapses (Messaoudi et al., 2007). Nossos resultados não demonstraram nenhuma atividade sobre a concentração desta proteína, ainda que a generalização da memória esteja em alguns casos correlacionada ainda que indiretamente com aumento na sua concentração (Shepherd and Bear, 2011).

Ademais, estudos de Götz e colaboradores (2016a, 2016b) usando imagens por ressonância magnética comparando pacientes sobreviventes de sepse e choque séptico com controles saudáveis apontaram diferenças funcionais e anatômicas importantes. As frequências alfa basais de pacientes sobreviventes de sepse tendem a ser menores que as de controles saudáveis, o que reflete um rebaixamento de estado geral. Também há prejuízo na resposta a estímulos externos novos, o que pode-se correlacionar também com estudos não-clínicos avaliando a memória espacial e o reconhecimento de objetos, ambas funções prejudicadas por modelos de CLP (Granger et al., 2013; Li et al., 2017).

4.2 HIPERALGESIA PÓS-SEPSE

Os resultados obtidos neste trabalho não correlacionam a generalização da memória de medo com a sensação de dor durante as sessões de treino ou teste. Observamos isso através dos testes de hiperalgesia que não demonstraram uma diminuição do limiar mecânico após o quinto dia depois de qualquer cirurgia utilizada.

A hipersensibilidade mecânica foi vista, sim, após as cirurgias, mas durou menos de dois dias para as falsas cirurgias e 3 a 4 dias para CLP.

Curiosamente, poucos relatos sobre a associação da sepse e da dor existem. Dados de Dowdy e colaboradores (2005) demonstraram, após revisão sistemática da literatura, diversos parâmetros de decréscimo da qualidade de vida após a sepse. A dor não estava correlacionada em muitos deles.

Considerando-se a seriedade e diligência em se tratar a sepse, o desfecho principal nos estudos é a mortalidade. Com o avanço nos conhecimentos ao seu respeito, a mudança no ponto de vista de “quantos morrem” para “quantos sobrevivem” vem ganhando mais respaldo e a literatura se enriquecendo com relatos tanto das consequências de longo prazo da sepse quanto das possíveis alternativas para resolvê-las. Assim, a dor na sepse acaba sendo um desfecho ofuscado por questões mais críticas em um primeiro momento.

Também pode-se citar uma questão ética no estudo da dor na sepse, já que todos os modelos experimentais de sepse induzem algum percentual de mortalidade (Ruiz et al., 2016). Perder animais, então, no estudo de um estado possivelmente transiente e “de menor importância” frente ao risco de vida acaba incorrendo neste problema.

Neste estudo, porém, tratando-se de uma avaliação dos efeitos tardios da sepse, os experimentos de hiperalgesia serviram inclusive como um controle para os testes posteriores no protocolo de CMC, dando suporte para que os mesmos não fossem atribuídos a hiperalgesia nas sessões de treino ou teste. Ainda que não tenhamos encontrado resultados significantes em se tratando da redução da hiperalgesia mecânica no tratamento da sepse, discutiremos à seguir a importância destes achados considerando cada sistema avaliado. Em tempo, esta é a primeira vez que se demonstra a hiperalgesia após a sepse.

4.3 O SISTEMA ENDOTELINÉRGICO NA SEPSE

Os experimentos usando o antagonista de receptores ET_A , BQ123, demonstraram um importante resultado na reversão da taxa de sobrevivência após a CLP com três furos. A administração i.c.v. do antagonista BQ123 4 h após a sepse melhorou a taxa de sobrevivência, o que vem ao encontro de resultados vistos em outros trabalhos (Leite-Avalca et al., 2016).

Os níveis de ET-1 encontram-se aumentados em diferentes modelos experimentais de sepse tanto na periferia (Ornan et al., 2000) como no SNC (Naito et al., 2014) e o bloqueio dos receptores ETA durante a sepse parece ser benéfico em melhorar parâmetros inflamatórios e a taxa de sobrevivência (Goto et al., 2010; Leite-Avalca et al., 2016).

O papel central de ET-1 na dor ainda necessita mais estudos. Apesar de ET-1 ser considerada pró-nociceptiva quando liberada periféricamente, há trabalhos que demonstram que a administração exógena deste mediador no SNC (i.c.v., intratecal ou na matéria periaquedutal cinzenta) resulta em efeitos anti-nociceptivos por meio de receptores ETA (D'Amico et al., 1997, 1996; Hasue et al., 2004; Kamei et al., 1993; Yamamoto et al., 1994). Corroborando estes estudos, camundongos hiperexpressando ET-1 em astrócitos têm resposta nociceptiva a formalina diminuída (Hung et al., 2012). Nossos resultados em não encontrar alterações na resposta hiperalgésica após a administração do BQ123 levanta duas possibilidades imediatas: a) apenas um tratamento agudo em um momento tão precoce em relação ao teste do limiar mecânico não seria capaz de promover mudanças detectáveis ou ainda b) considerando-se o efeito anti-nociceptivo da ET-1, a hiperalgisia induzida pela sepse seria demasiado intensa para ser aumentada ainda mais pela administração de um antagonista dos receptores ETA.

Apesar do bloqueio dos receptores ET_A ter aumentado a taxa de sobrevivência, não afetou a generalização da memória de medo no nosso modelo de CMC. É importante notar, neste sentido, que o bloqueio central dos efeitos da ET-1 durante a sepse parecem estar relacionados principalmente com o reestabelecimento dos níveis circulantes de AVP e melhora da reatividade vascular (Leite-Avalca et al., 2019). Uma evidência limitada que contribui para esta possibilidade é que o bloqueio do receptor ET_A também não foi capaz de reduzir o parâmetro inflamatório escolhido como marcador de neuroinflamação neste trabalho, o TNF- α . Isto estreita o número de possibilidades para este mecanismo, contribuindo com a proposição de mecanismo sugerido por Leite-Avalca e colaboradores (2016, 2019; 2018)

Os nossos resultados sugerem, então, que apesar do nível elevado de ET-1 durante a sepse serem decisivos no desfecho final da doença (vida ou morte), não está relacionado com a generalização da memória nos sobreviventes.

4.4 O SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA SEPSE

Os resultados obtidos no experimento 3 revelam algumas características da participação do sistema eCB na sepse. O bloqueio do receptor CB₁ 4 h após a CLP melhorou a taxa de sobrevivência a níveis próximos de Sham e também o efeito tardio, a generalização da memória de medo. Este último resultado também foi visto com o bloqueio do receptor CB₂.

A correlação entre o sistema eCB e endotelinérgico cuja hipótese foi explorada neste trabalho, bem como em outros do grupo, partiu do estudo de Zampronio e colaboradores (2010). Nele demonstrou-se que ET-1 induz a liberação de eCBs que agem de maneira pré-sináptica, reduzindo correntes excitatórias pós-sinápticas de células produtoras de AVP. Conforme a Figura 2, o mecanismo pelo qual o bloqueio de receptores eCB promoveriam melhora na taxa de sobrevivência e outros parâmetros descritos por Leite-Avalca e colaboradores (2016, 2019) viria do bloqueio da inibição sobre as sinapses glutamatérgicas sobre as MNCs. Estas células estariam tendo sua neurotransmissão inibida por meio da extensa ativação do receptor CB₁.

Destacamos que a hipótese daqueles trabalhos partiu das observações feitas em experimentos de células hipotalâmicas (Zampronio et al., 2010), e que esta estrutura não é uma área primariamente envolvida na formação da memória ou no aprendizado aversivo. Em se tratando do hipocampo, porém, a liberação de eCBs é importante em ambos os processos (Lisboa et al., 2019). Novamente, diversos estudos, incluindo este trabalho, demonstram que a liberação central destes mediadores é importante durante a sepse (Leite-Avalca et al., 2016; Villanueva et al., 2009) e podem ser liberados por diferentes células no SNC (e.g. astrócitos e micróglia) (Cabral et al., 2008).

A este respeito, o bloqueio dos receptores CB₁ no SNC durante a fase inicial da sepse não apenas melhorou a mortalidade associada com a doença da mesma forma que já demonstrado por Leite-Avalca e colaboradores (Leite-Avalca et al., 2016), como também aboliu a generalização da memória de medo treze dias depois. Notável também é que este efeito se manteve no teste subsequente, vinte dias depois. Resultados semelhantes foram obtidos com o antagonista para receptores CB₂, o AM630, o que sugere que a liberação de eCBs agindo em ambos os receptores CB₁ e CB₂ durante a fase inicial da sepse estaria promovendo mudanças na circuitaria neural que fundamenta a formação da memória aversiva. Isto seria parte do

mecanismo que leva a uma resposta de medo generalizado que perdura por longos períodos (pelo menos 20 dias, demonstrado aqui).

Os receptores CB1 são os receptores canabinoides mais comuns no cérebro e o seu envolvimento na aquisição, consolidação e extinção da memória já foi bem descrito (Marsicano et al., 2002; Takahashi et al., 2005; Wolff and Leander, 2003). O bloqueio da hidrolase de amidas de ácidos-graxos com URB597 no hipocampo ou a administração sistêmica de canabidiol (CBD) reduziu a generalização da memória de medo (Stern et al., 2017). Também, a ativação de receptores CB2 melhorou o déficit de memória hipocampo-dependente induzido por cirurgia (Sun et al., 2017). Estes resultados sugerem que a ativação de receptores CB1 e/ou CB2 preveniriam a generalização da memória de medo, quando neste trabalho vimos exatamente o oposto. À este respeito notamos que no trabalho de Stern e colaboradores (2017) os animais não tinham nenhuma lesão anterior e a atenuação da generalização da memória vista foi após uma injeção local de CBD ou URB597 após a aquisição da memória de medo, o que resulta num aumento no nível de anandamida no cérebro (Elmes et al., 2015). Assim, os antagonistas AM251 e AM630 administrados após a aquisição bloquearam a atenuação induzida por CBD. Neste trabalho os animais foram submetidos ao protocolo de CMC 10 dias após a CLP e o tratamento com a administração dos antagonistas. Além disso deve-se considerar que, diferente de um aumento causado por CBD, a sepse é caracterizada por uma desregulação em diversos sistemas e, assim, a produção de eCB no SNC durante esta condição é, provavelmente, muito mais intensa e duradoura.

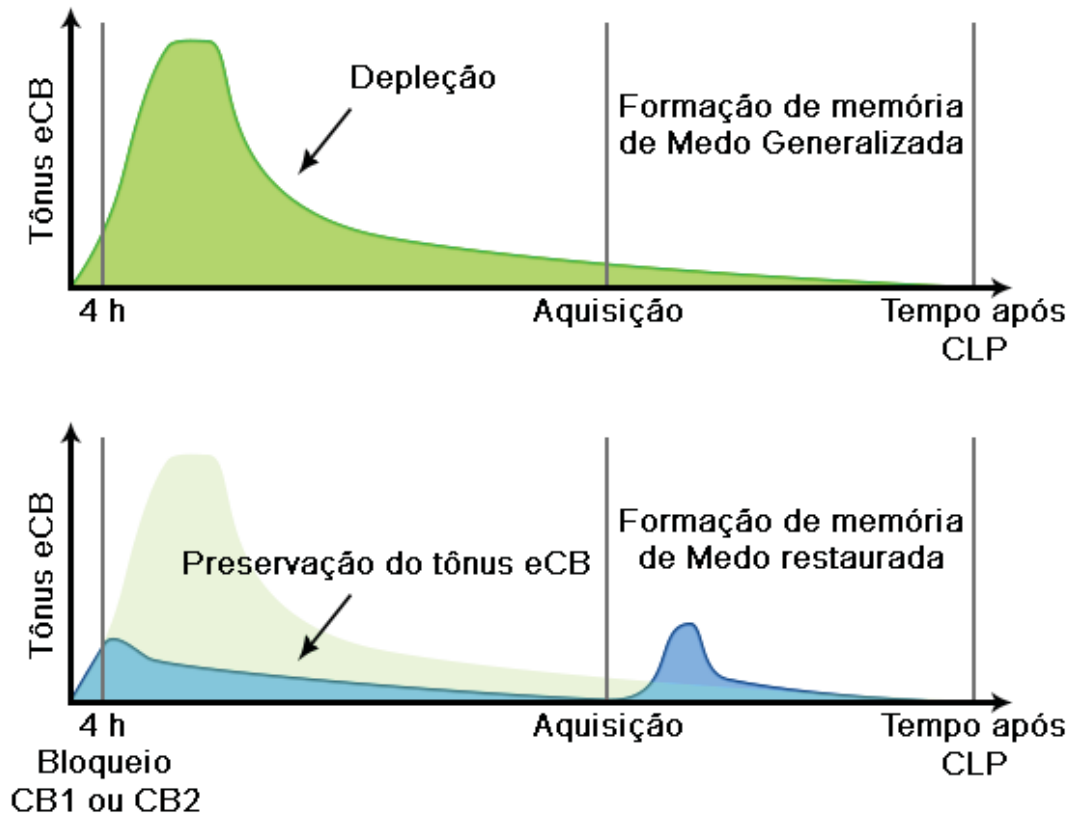


Figura 10 – Depleção do tônus eCB após a sepse

Hipótese do trabalho, onde uma extensiva liberação de endocanabinoides durante a sepse é responsável pelos desfechos negativos associados a falência de órgãos e também na depleção do tônus eCB, favorecendo a generalização da memória após aquisição. A preservação da ativação eCB com antagonistas no início da sepse restaura a capacidade de ativação deste sistema tardiamente.

FONTE: O autor.

Uma hipótese com a qual trabalhamos foi a de que após uma liberação intensa e duradoura de eCB durante a fase inicial da sepse existe uma depleção do tônus eCB, esquematizado na Figura 10. Esta mudança drástica na maneira com a qual este sistema se comporta promoveria, então, uma cascata de outras alterações estruturais e/ou funcionais na circuitaria neural revolvendo as memórias de medo e o sistema eCB (e.g. síntese e liberação de eCBs, expressão de receptores, acoplamento de receptores, etc). Considerando o papel do sistema eCB em atenuar respostas de estresse (Lisboa et al., 2019), as alterações induzidas por CLP poderiam ser responsáveis pela generalização da resposta de medo observada nos sobreviventes. Assim, o bloqueio dos receptores canabinoides durante essa liberação intensa de eCBs nos estágios iniciais da sepse preveniria as mudanças na circuitaria, resultando

em menores desfechos cognitivos negativos a longo prazo. Quais mudanças ocorrem no sistema após a sepse ainda necessita de maior esclarecimento.

Em se tratando especificamente do receptor CB₂, seu papel no sistema proposto parece sobrepor aquele do receptor CB₁. Algumas evidências devem ser levadas em conta ao analisar os resultados aqui obtidos. Primeiramente, o receptor CB₂ medeia efeitos antinociceptivos de maneira independente do estado inflamatório (Beltramo et al., 2006). Neste trabalho não obtivemos nenhuma alteração no estado hiperalgésico visto após a sepse tratada com antagonista de receptores CB₂. Levamos em conta, porém, que a administração única longe dos momentos de teste da hiperalgesia e via i.c.v. diferem bastante dos métodos utilizados por Beltramo e colaboradores (2006), que viram diferenças após administração sistêmica, podendo os efeitos vistos na fase nociceptiva da formalina e na dor neuropática serem mediados por mecanismos periféricos, apesar de evidências de alterações centrais naquele trabalho.

Os receptores CB₂ têm sua expressão aumentada na sepse e parte dessa resposta se dá pelo perfil neuroinflamatório (Benito et al., 2008) visto que também experimentalmente esta condição causa aumento a expressão do receptor (Mukhopadhyay et al., 2006). Então, possivelmente alguns dos efeitos do receptor CB₂ podem estar sendo mediados pela sua influência sobre a neuroinflamação.

4.5 A NEUROINFLAMAÇÃO NA SEPSE

Um dos estados de doença no qual a expressão de receptores CB₂ no SNC está aumentada é a sepse. A ativação deste receptor tem efeitos periféricos anti-inflamatórios (Samson et al., 2003), com relatos também sobre a ação central (revisado em Benito et al., 2008). Nós não encontramos diferença nos níveis de TNF- α após o tratamento com AM630. Também, este é o primeiro relato de uma administração central de AM630 como tratamento em um modelo experimental de sepse. Granger e colaboradores (2013) demonstraram o aumento dos níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias em regiões discretas do cérebro, incluindo o hipocampo, por método de dosagem semelhante ao usado neste trabalho. Diferenças importantes foram que, naquela publicação, 1) os animais utilizados eram camundongos, 2) a taxa de sobrevivência foi maior e 3) todos os animais receberam tratamento com antibiótico de amplo espectro, o que subentenderia um processo de

sepsis menos severo que o que relatamos aqui. Com isto em mente, os níveis de TNF- α encontrados por aquele grupo foram muito menores que os que nós encontramos em todos os grupos experimentais, incluindo Sham e tratado com minociclina, único tratamento que reverteu os níveis de TNF- α .

O ambiente neuroinflamatório induzido pela sepsis é capaz de causar mudanças significativas e drásticas no comportamento dos sobreviventes (Granger et al., 2013). A sepsis parece promover alterações nos circuitos responsáveis pelo processamento e aprendizado aversivo. O hipocampo, amígdala, córtex infralímbico e pré-límbico estão envolvidos nesses processos (para uma revisão, ver Lisboa et al., 2019). Levando isso em consideração, há relatos de que a sepsis induzida por CLP aumenta a neuroinflamação no hipocampo (Xing et al., 2018) e córtex pré-frontal (Granger et al., 2013).

Além disso, a disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, a neuroinflamação (Wu et al., 2015) bem como microgliose e mediadores da via JAK/STAT3 são encontrados em períodos tardios, equivalentes aos utilizados neste estudo, após sobreviver a sepsis (Huang et al., 2018). Estes mecanismos poderiam estar por trás da facilitação da consolidação e generalização da memória de medo após a sepsis.

A microgliose é encontrada no ambiente neuroinflamatório, o que já foi descrito como um fator crucial em diversas alterações comportamentais induzidas por procedimentos cirúrgicos (Huang et al., 2018; Safavynia and Goldstein, 2018; Sun et al., 2017) incluindo a CLP (Granger et al., 2013; Michels et al., 2015). Então, de modo a avaliar se a inibição da ativação da micróglia e, assim, a neuroinflamação, conseguiríamos reverter a generalização da memória, foi feita a administração do inibidor de micróglia, a minociclina. Confirmando a nossa hipótese, o tratamento com a minociclina foi capaz de abolir a generalização da resposta de medo, sugerindo que sim, a ativação da micróglia contribui para a generalização da memória de medo induzida por CLP. Estes dados vão ao encontro de outros demonstrando que o modelo de CLP induz ativação microglial no hipocampo de camundongos (Zong et al., 2019). Como mencionado, a consolidação do medo pode estar relacionada a generalização do medo (Gazarini et al., 2014; Stern et al., 2018). Porém, o padrão de separação, uma função do hipocampo necessária para diferenciar estímulos é também relacionada a generalização do medo (Lange et al., 2017). Assim, sugerimos que a inflamação no hipocampo causa uma incapacidade nos processos envolvendo o

padrão de separação e, desta maneira, aumentam a generalização da memória de medo.

Importante na consideração deste resultado é que a administração central de minociclina 4 h após a CLP foi capaz de reverter o aumento de TNF- α . Esta reversão ocorreu dentro de um período de tempo onde as citocinas pró-inflamatórias estão em um pico (Granger et al., 2013). Tardiamente vimos, então, que também a generalização da memória foi revertida no grupo de animais tratado com minociclina. Assim, demonstra-se que a inibição da neuroinflamação durante o processo de sepse pode prevenir algumas das consequências de longo prazo da doença.

Os efeitos neuroprotetores da minociclina já têm relatos na literatura (Michels et al., 2015). Tratando-se de um agente antibacteriano com custo relativamente reduzido, seu uso na pesquisa é extensivamente via intraperitoneal sistêmica e, devido as suas características farmacológicas, tem boa permeabilidade ao SNC, então seus efeitos neuroprotetivos são vistos por esta via, mas não descartam efeitos periféricos (Habibi-Asl et al., 2009). Então, ainda que a minociclina e não outras tetraciclina seja capaz de aumentar a taxa de sobrevivência bem como desfechos cognitivos da sepse (Adembri et al., 2014), seu efeito antibacteriano deve ser considerado (Newcomb et al., 1998). Neste trabalho, porém, vimos apenas os efeitos da administração central e, portanto, exclusivamente sua ação neuroprotetora, visto que o sítio de infecção desencadeador da sepse no nosso modelo era o peritônio.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra evidências para a ocorrência da facilitação da generalização da memória de medo tardia em sobreviventes da sepse utilizando modelo animal em ratos. Também avaliou como o bloqueio dos receptores ETA, CB1 e CB2, bem como a neuroinflamação contribui para o estabelecimento desta condição.

O modelo de CLP utilizado neste trabalho diminui significativamente a taxa de sobrevivência até cinco dias após o procedimento. Também observou-se hiperalgesia mecânica persistente por até 4 dias depois da cirurgia. Observamos, ainda, facilitação da generalização da memória de medo 13 dias após a CLP, bem como maior persistência da memória de medo nos animais submetidos a CLP com 3 furos 20 dias após.

O tratamento da sepse 4 h após a CLP com três furos utilizando antagonista de receptores ETA recupera a taxa de sobrevivência mas não parece exercer efeito sobre os parâmetros de memória avaliados neste trabalho. Por sua vez, o tratamento com um antagonista de receptores CB1 recupera a taxa de sobrevivência assim como traz uma diminuição a generalização da memória observada 13 e 20 dias depois da CLP. O tratamento com antagonista de receptores CB2 não altera a taxa de sobrevivência mas também reduz a generalização da memória observada 13 dias após depois da CLP. O bloqueio da neuroinflamação no início da sepse não altera a taxa de sobrevivência causada pela CLP de três furos mas reduz a generalização da memória. Nenhum tratamento utilizado no trabalho causou alterações na hiperalgesia mecânica 2 dias após falsa cirurgia ou CLP. Além disso, exceto pelo tratamento com minociclina i.c.v., não foram observados efeitos sobre a neuroinflamação 8 h após CLP. Os eventos relacionados a generalização e aumento da persistência da memória de medo descritos neste trabalho não parecem estar relacionados a alterações na expressão da proteína Arc no hipocampo dorsal.

6 REFERÊNCIAS

- Adembri, C., Selmi, V., Vitali, L., Tani, A., Margheri, M., Loriga, B., Carlucci, M., Nosi, D., Formigli, L., De Gaudio, A.R., 2014. Minocycline but not tigecycline is neuroprotective and reduces the neuroinflammatory response induced by the superimposition of sepsis upon traumatic brain injury. *Crit. Care Med.* 42. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000414>
- Barichello, T., Sayana, P., Giridharan, V. V, Arumanayagam, A.S., Narendran, B., Della Giustina, A., Petronilho, F., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F., 2019. Long-Term Cognitive Outcomes After Sepsis: a Translational Systematic Review. *Mol Neurobiol* 56, 186–251. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1048-2>
- Beltramo, M., Bernardini, N., Bertorelli, R., Campanella, M., Nicolussi, E., Fredduzzi, S., Reggiani, A., 2006. CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: Possible direct involvement of neural mechanisms. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1530–1538. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04684.x>
- Benito, C., Tolón, R.M., Pazos, M.R., Núñez, E., Castillo, A.I., Romero, J., 2008. Cannabinoid CB 2 receptors in human brain inflammation. *Br. J. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707505>
- Besnard, A., Sahay, A., 2016. Adult Hippocampal Neurogenesis, Fear Generalization, and Stress. *Neuropsychopharmacology* 41, 24–44. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.167>
- Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 1969. Crouching as an index of fear. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 67, 370–375. <https://doi.org/10.1037/h0026779>
- Blankman, J.L., Simon, G.M., Cravatt, B.F., 2007. A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* 14, 1347–1356. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.11.006>
- Boer, K.R., van Ruler, O., van Emmerik, A.A., Sprangers, M.A., de Rooij, S.E., Vroom, M.B., de Borgie, C.A., Boermeester, M.A., Reitsma, J.B., Group, D.P.S., 2008. Factors associated with posttraumatic stress symptoms in a prospective cohort of patients after abdominal sepsis: a nomogram. *Intensive Care Med* 34,

664–674. <https://doi.org/10.1007/s00134-007-0941-3>

- Bouallegue, A., Bou Daou, G., Srivastava, A., 2007. Endothelin-1-Induced Signaling Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 5, 45–52. <https://doi.org/10.2174/157016107779317161>
- Cabral, G.A., Raborn, E.S., Griffin, L., Dennis, J., Marciano-Cabral, F., 2008. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol* 153, 240–251. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707584>
- Cannon, J.G., Tompkins, R.G., Gelfand, J.A., Michie, H.R., Stanford, G.G., van der Meer, J.W.M., Endres, S., Lonnemann, G., Corsetti, J., Chernow, B., Wilmore, D.W., Wolff, S.M., Burke, J.F., Dinarello, C.A., 1990. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J. Infect. Dis.* 161, 79–84. <https://doi.org/10.1093/infdis/161.1.79>
- Cohen, J., 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885–891. <https://doi.org/10.1038/nature01326>
- Czerniawski, J., Guzowski, J.F., 2014. Acute neuroinflammation impairs context discrimination memory and disrupts pattern separation processes in hippocampus. *J Neurosci* 34, 12470–12480. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0542-14.2014>
- D'Amico, M., Dashwood, M.R., Warner, T.D., 1996. Endothelin-1 and the periaqueductal gray area of the rat: an autoradiographic and functional pharmacological study. *Br. J. Pharmacol.* 118, 21–26. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15361.x>
- D'Amico, M., Di Filippo, C., Rossi, F., 1997. Selective and non-selective ET antagonists reveal an ET(A)/ET(B) receptor mediated ET-1-induced antinociceptive effect in PAG area of mice. *Life Sci.* 61, PL 397-401. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(97\)00988-0](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(97)00988-0)
- da Silva, T.R., Takahashi, R.N., Bertoglio, L.J., Andreatini, R., Stern, C.A., 2016. Evidence for an expanded time-window to mitigate a reactivated fear memory by tamoxifen. *Eur Neuropsychopharmacol* 26, 1601–1609.

<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.08.005>

De Cruz, S.J., Kenyon, N.J., Sandrock, C.E., 2009. Bench-to-bedside review: The role of nitric oxide in sepsis. *Expert Rev. Respir. Med.*

<https://doi.org/10.1586/ers.09.39>

Dowdy, D.W., Eid, M.P., Sedrakyan, A., Mendez-Tellez, P.A., Pronovost, P.J., Herridge, M.S., Needham, D.M., 2005. Quality of life in adult survivors of critical illness: A systematic review of the literature. *Intensive Care Med.*

<https://doi.org/10.1007/s00134-005-2592-6>

Dudai, Y., 2004. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55, 51–86.

<https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>

Elmes, M.W., Kaczocha, M., Berger, W.T., Leung, K., Ralph, B.P., Wang, L., Sweeney, J.M., Miyauchi, J.T., Tsirka, S.E., Ojima, I., Deutsch, D.G., 2015. Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). *J Biol Chem* 290, 8711–8721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.618447>

Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N.K.J., Hartog, C.S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D.C., Reinhart, K., 2016. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 259–272.

<https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC>

Freund, T.F., Katona, I., Piomelli, D., 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2003>

Gazarini, L., Stern, C.A., Piornedo, R.R., Takahashi, R.N., Bertoglio, L.J., 2014. PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. *Int J Neuropsychopharmacol* 18.

<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu026>

Goto, T., Hussein, M.H., Kato, S., Daoud, G.A., Kato, T., Kakita, H., Mizuno, H., Imai,

- M., Ito, T., Kato, I., Suzuki, S., Okada, N., Togari, H., Okada, H., 2010. Endothelin receptor antagonist attenuates inflammatory response and prolongs the survival time in a neonatal sepsis model. *Intensive Care Med* 36, 2132–2139. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-2040-0>
- Götz, T., Baumbach, P., Huonker, R., Kranczioch, C., Witte, O.W., Debener, S., Klingner, C., Brunkhorst, F.M., Günther, A., 2016a. Slowed peak resting frequency and MEG overactivation in survivors of severe sepsis and septic shock. *Clin. Neurophysiol.* 127, 1247–1253. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2015.07.021>
- Götz, T., Baumbach, P., Reuken, P., Huonker, R., Kranczioch, C., Debener, S., Brunkhorst, F.M., Witte, O.W., Klingner, C., Günther, A., 2016b. The loss of neural synchrony in the post septic brain. *Clin. Neurophysiol.* 127, 2200–2207. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2016.02.006>
- Granger, J.I., Ratti, P.L., Datta, S.C., Raymond, R.M., Opp, M.R., 2013. Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. *Psychoneuroendocrinology* 38, 1047–1057. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.10.010>
- Habibi-Asl, B., Hassanzadeh, K., Charkhpour, M., 2009. Central administration of minocycline and riluzole prevents morphine-induced tolerance in rats. *Anesth Analg* 109, 936–942. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e3181ae5f13>
- Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Kano, M., 2007. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist*. <https://doi.org/10.1177/1073858406296716>
- Hasue, F., Kuwaki, T., Yamada, H., Fukuda, Y., Shimoyama, M., 2004. Inhibitory actions of endothelin-1 on pain processing. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44 Suppl 1, S318-20. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000166271.40044.0c>
- Hauer, D., Schelling, G., Gola, H., Campolongo, P., Morath, J., Roozendaal, B., Hamuni, G., Karabatsiakos, A., Atsak, P., Vogeser, M., Kolassa, I.T., 2013. Plasma Concentrations of Endocannabinoids and Related Primary Fatty Acid Amides in Patients with Post-Traumatic Stress Disorder. *PLoS One* 8.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062741>

Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., De Costa, B.R., Rice, K.C., 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1932–1936. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1932>

Hillard, C.J., 2018. Circulating Endocannabinoids: From Whence Do They Come and Where are They Going? *Neuropsychopharmacology* 43, 155–172. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.130>

Huang, C., Irwin, M.G., Wong, G.T.C., Chang, R.C.C., 2018. Evidence of the impact of systemic inflammation on neuroinflammation from a non-bacterial endotoxin animal model. *J Neuroinflammation* 15, 147. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1163-z>

Hung, V.K.L., Chen, S.M.Y., Tai, L.W., Chen, A.Y.S., Chung, S.K., Cheung, C.W., 2012. Over-expression of endothelin-1 in astrocytes, but not endothelial cells, ameliorates inflammatory pain response after formalin injection. *Life Sci.* 91, 618–622. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.06.038>

Igaz, L.M., Vianna, M.R.M., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2002. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J. Neurosci.* 22, 6781–6789. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-15-06781.2002>

Iwashyna, T.J., Ely, E.W., Smith, D.M., Langa, K.M., 2010. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 304, 1787–1794. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1553>

Kamei, J., Hitosugi, H., Kawashima, N., Misawa, M., Kasuya, Y., 1993. Antinociceptive effects of intrathecally administered endothelin-1 in mice. *Neurosci. Lett.* 153, 69–72. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90079-z](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90079-z)

Kowalczyk, A., Kleniewska, P., Kolodziejczyk, M., Skibska, B., Goraca, A., 2015. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 63, 41–52. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0310-1>

- Lange, I., Goossens, L., Michielse, S., Bakker, J., Lissek, S., Papalini, S., Verhagen, S., Leibold, N., Marcelis, M., Wichers, M., Lieveerse, R., van Os, J., van Amelsvoort, T., Schruers, K., 2017. Behavioral pattern separation and its link to the neural mechanisms of fear generalization. *Soc Cogn Affect Neurosci* 12, 1720–1729. <https://doi.org/10.1093/scan/nsx104>
- Leite-Avalca, M.C., Lomba, L.A., Bastos-Pereira, A.L., Brito, H.O., Fraga, D., Zampronio, A.R., 2016. Involvement of Central Endothelin ETA and Cannabinoid CB1 Receptors and Arginine Vasopressin Release in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture in Rats. *Shock* 46, 290–296. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000598>
- Leite-Avalca, M.C.G., 2018. ENDOTELINA-1, ENDOCANABINÓIDES E ARGININA VASOPRESSINA NA SEPSE INDUZIDA POR LIGADURA E PUNÇÃO DO CECO EM RATOS CURITIBA 2018. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.
- Leite-Avalca, M.C.G., Staats, F.T., Verona, D., de Souza, P., Almeida, M.C., Silva-Santos, J.E., Zampronio, A.R., 2019. Cannabinoid CB1 Receptor Antagonist Rimonabant Decreases Levels of Markers of Organ Dysfunction and Alters Vascular Reactivity in Aortic Vessels in Late Sepsis in Rats. *Inflammation* 42, 618–627. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0919-z>
- Li, Y., Wang, F., Luo, Y., 2017. Ginsenoside Rg1 protects against sepsis-associated encephalopathy through beclin 1-independent autophagy in mice. *J. Surg. Res.* 207, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.08.080>
- Limebeer, C.L., Vemuri, V.K., Bedard, H., Lang, S.T., Ossenkopp, K.P., Makriyannis, A., Parker, L.A., 2010. Inverse agonism of cannabinoid CB1 receptors potentiates LiCl-induced nausea in the conditioned gaping model in rats. *Br J Pharmacol* 161, 336–349. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00885.x>
- Lisboa, S.F., Vila-Verde, C., Rosa, J., Uliana, D.L., Stern, C.A.J., Bertoglio, L.J., Resstel, L.B., Guimaraes, F.S., 2019. Tempering aversive/traumatic memories with cannabinoids: a review of evidence from animal and human studies. *Psychopharmacol.* 236, 201–226. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5127-x>
- Lundberg, O.H.M., Bergenzaun, L., Rydén, J., Rosenqvist, M., Melander, O., Chew,

- M.S., 2016. Adrenomedullin and endothelin-1 are associated with myocardial injury and death in septic shock patients. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1361-y>
- Ma, L., Zhang, H., Yin, Y. ling, Guo, W. zhi, Ma, Y. qun, Wang, Y. bo, Shu, C., Dong, L. qiang, 2016. Role of interleukin-6 to differentiate sepsis from non-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Cytokine* 88, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.033>
- Madar, A.D., Ewell, L.A., Jones, M. V., 2019. Temporal pattern separation in hippocampal neurons through multiplexed neural codes. *PLoS Comput. Biol.* 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006932>
- Maemura, K., Kurihara, H., Morita, T., Oh-hashii, Y., Yazaki, Y., 1992. Production of Endothelin-1 in Vascular Endothelial Cells Is Regulated by Factors Associated with Vascular Injury. *Gerontology* 38, 29–35. <https://doi.org/10.1159/000213360>
- Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgansberger, W., Di Marzo, V., Lutz, B., 2002. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418, 530–534. <https://doi.org/10.1038/nature00839>
- McCarron, R.M., Wang, L., Stanimirovic, D.B., Spatz, M., 1993. Endothelin induction of adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci. Lett.* 156, 31–4. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90432-k](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90432-k)
- McGaugh, J.L., 2000. Memory - A century of consolidation. *Science* (80-.). <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
- McKenna, S., Gossling, M., Bugarini, A., Hill, E., Anderson, A.L., Rancourt, R.C., Balasubramanian, N., El Kasmi, K.C., Wright, C.J., 2015. Endotoxemia Induces I κ B β /NF- κ B–Dependent Endothelin-1 Expression in Hepatic Macrophages. *J. Immunol.* 195, 3866–3879. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501017>
- Messaoudi, E., Kanhema, T., Soulé, J., Tiron, A., Dageyte, G., Da Silva, B., Bramham, C.R., 2007. Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate

gyrus in vivo. *J. Neurosci.* 27, 10445–10455.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2883-07.2007>

Michels, M., Vieira, A.S., Vuolo, F., Zapelini, H.G., Mendonça, B., Mina, F., Domingui, D., Steckert, A., Schuck, P.F., Quevedo, J., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., 2015. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 43, 54–59.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.07.002>

Morgado-Bernal, I., 2011. Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. *Neuroscience* 176, 12–19.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.056>

Mukhopadhyay, S., Das, S., Williams, E.A., Moore, D., Jones, J.D., Zahm, D.S., Ndengele, M.M., Lechner, A.J., Howlett, A.C., 2006. Lipopolysaccharide and cyclic AMP regulation of CB2 cannabinoid receptor levels in rat brain and mouse RAW 264.7 macrophages. *J. Neuroimmunol.* 181, 82–92.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.08.002>

Naito, Y., Yoshioka, K., Tanaka, K., Tatsumi, K., Kimura, S., Kasuya, Y., 2014. Endothelin B receptor-mediated encephalopathic events in mouse sepsis model. *Life Sci* 118, 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.03.012>

Napolitano, L.M., 2018. Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. *Surg. Infect. (Larchmt)*. 19, 117–125. <https://doi.org/10.1089/sur.2017.278>

Neumeister, A., Normandin, M.D., Pietrzak, R.H., Piomelli, D., Zheng, M.Q., Gujarró-Anton, A., Potenza, M.N., Bailey, C.R., Lin, S.F., Najafzadeh, S., Ropchan, J., Henry, S., Corsi-Travali, S., Carson, R.E., Huang, Y., 2013. Elevated brain cannabinoid CB 1 receptor availability in post-traumatic stress disorder: A positron emission tomography study. *Mol. Psychiatry* 18, 1034–1040.
<https://doi.org/10.1038/mp.2013.61>

Newcomb, D., Bolgos, G., Green, L., Remick, D.G., 1998. Antibiotic treatment influences outcome in murine sepsis: Mediators of increased morbidity. *Shock* 10, 110–117. <https://doi.org/10.1097/00024382-199808000-00005>

- Ornan, D.A., Chaudry, I.H., Wang, P., 2000. The dissociation between upregulated endothelins and hemodynamic responses during polymicrobial sepsis. *Biochim Biophys Acta* 1501, 211–218. [https://doi.org/10.1016/s0925-4439\(00\)00025-9](https://doi.org/10.1016/s0925-4439(00)00025-9)
- Pacheco, D. F., Klein, A., Perez, A.C., Pacheco, C.M., de Francischi, J.N., Reis, G.M., Duarte, I.D., 2009. Central antinociception induced by mu-opioid receptor agonist morphine, but not delta- or kappa-, is mediated by cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol* 158, 225–231. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00310.x>
- Paxinos, G., Watson, C.C.N.-573. 863319352022. 22 B.L.S.T.I. (TB) G.F. 30 (R1) blsrisc B.L.S.T.I.R.E.S. (OB) G.F. 30 (R1) blsrisc B.L.D.S.C.V. 500., 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed. ed. Elsevier, Amsterdam.
- Piechota, M., Banach, M., Irzmanski, R., Barylski, M., Piechota-Urbanska, M., Kowalski, J., Pawlicki, L., 2007. Plasma Endothelin-1 Levels in Septic Patients. *J. Intensive Care Med.* 22, 232–239. <https://doi.org/10.1177/0885066607301444>
- Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A., Rodríguez de Fonseca, F., 2000. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 218–24. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01482-6](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01482-6)
- Ratano, P., Palmery, M., Trezza, V., Campolongo, P., 2017. Cannabinoid modulation of memory consolidation in rats: Beyond the role of cannabinoid receptor subtype 1. *Front. Pharmacol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00200>
- Rom, S., Persidsky, Y., 2013. Cannabinoid receptor 2: Potential role in immunomodulation and neuroinflammation. *J. Neuroimmune Pharmacol.* <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9445-9>
- Rossi, N.F., Maliszewska-Scislo, M., Chen, H., 2008. Central endothelin: Effects on vasopressin and the arterial baroreflex in doxorubicin heart failure rats, in: *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. pp. 343–352. <https://doi.org/10.1139/Y08-027>
- Ruiz, S., Vardon-Bounes, F., Merlet-Dupuy, V., Conil, J.M., Buléon, M., Fourcade, O., Tack, I., Minville, V., 2016. Sepsis modeling in mice: ligation length is a major

severity factor in cecal ligation and puncture. *Intensive Care Med Exp* 4, 22.
<https://doi.org/10.1186/s40635-016-0096-z>

Safavynia, S.A., Goldstein, P.A., 2018. The Role of Neuroinflammation in Postoperative Cognitive Dysfunction: Moving From Hypothesis to Treatment. *Front Psychiatry* 9, 752. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00752>

Samson, M.-T., Small-Howard, A., Shimoda, L.M.N., Koblan-Huberson, M., Stokes, A.J., Turner, H., 2003. Differential Roles of CB1 and CB2 Cannabinoid Receptors in Mast Cells. *J. Immunol.* 170, 4953–4962.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.10.4953>

Sankowski, R., Mader, S., Valdés-Ferrer, S.I., 2015. Systemic inflammation and the brain: Novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* 9.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00028>

Santoro, A., 2013. Reassessing pattern separation in the dentate gyrus. *Front. Behav. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00096>

Schulte, W., Bernhagen, J., Bucala, R., 2013. Cytokines in sepsis: Potent immunoregulators and potential therapeutic targets - An updated view. *Mediators Inflamm.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/165974>

Shepherd, J.D., Bear, M.F., 2011. New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* <https://doi.org/10.1038/nn.2708>

Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.D., Coopersmith, C.M., Hotchkiss, R.S., Levy, M.M., Marshall, J.C., Martin, G.S., Opal, S.M., Rubenfeld, G.D., van der Poll, T., Vincent, J.L., Angus, D.C., 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801–810.
<https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>

Stern, C.A.J., da Silva, T.R., Raymundi, A.M., de Souza, C.P., Hiroaki-Sato, V.A., Kato, L., Guimarães, F.S., Andreatini, R., Takahashi, R.N., Bertoglio, L.J., 2017. Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories

- via dorsal hippocampus CB. *Neuropharmacology* 125, 220–230.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.07.024>
- Stern, C.A.J., de Carvalho, C.R., Bertoglio, L.J., Takahashi, R.N., 2018. Effects of Cannabinoid Drugs on Aversive or Rewarding Drug-Associated Memory Extinction and Reconsolidation. *Neuroscience* 370, 62–80.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.018>
- Sun, L., Dong, R., Xu, X., Yang, X., Peng, M., 2017. Activation of cannabinoid receptor type 2 attenuates surgery-induced cognitive impairment in mice through anti-inflammatory activity. *J Neuroinflammation* 14, 138.
<https://doi.org/10.1186/s12974-017-0913-7>
- Takahashi, R.N., Pamplona, F.A., Fernandes, M.S., 2005. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci. Lett.* 380, 270–275.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.01.049>
- Terrando, N., Rei Fidalgo, A., Vizcaychipi, M., Cibelli, M., Ma, D., Monaco, C., Feldmann, M., Maze, M., 2010. The impact of IL-1 modulation on the development of lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction. *Crit. Care* 14.
<https://doi.org/10.1186/cc9019>
- Villanueva, A., Yilmaz, S.M., Millington, W.R., Cutrera, R.A., Stouffer, D.G., Parsons, L.H., Cheer, J.F., Feleder, C., 2009. Central cannabinoid 1 receptor antagonist administration prevents endotoxic hypotension affecting norepinephrine release in the preoptic anterior hypothalamic area. *Shock* 32, 614–620.
<https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181a4fd8f>
- Watson, P., 2019. PTSD as a Public Mental Health Priority. *Curr Psychiatry Rep* 21, 61. <https://doi.org/10.1007/s11920-019-1032-1>
- Wolff, M.C., Leander, J.D., 2003. SR141716A, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, improves memory in a delayed radial maze task. *Eur. J. Pharmacol.* 477, 213–217. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.08.025>
- Wu, J., Zhang, M., Hao, S., Jia, M., Ji, M., Qiu, L., Sun, X., Yang, J., Li, K., 2015.

- Mitochondria-Targeted Peptide Reverses Mitochondrial Dysfunction and Cognitive Deficits in Sepsis-Associated Encephalopathy. *Mol. Neurobiol.* 52, 783–791. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8918-z>
- Xing, W., Huang, P., Lu, Y., Zeng, W., Zuo, Z., 2018. Amantadine attenuates sepsis-induced cognitive dysfunction possibly not through inhibiting toll-like receptor 2. *J Mol Med* 96, 391–402. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1631-z>
- Yamamoto, T., Shimoyama, N., Asano, H., Mizuguchi, T., 1994. Analysis of the role of endothelin-A and endothelin-B receptors on nociceptive information transmission in the spinal cord with FR139317, an endothelin-A receptor antagonist, and sarafotoxin S6c, an endothelin-B receptor agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 156–163.
- Yehuda, R., Hoge, C.W., McFarlane, A.C., Vermetten, E., Lanius, R.A., Nievergelt, C.M., Hobfoll, S.E., Koenen, K.C., Neylan, T.C., Hyman, S.E., 2015. Post-traumatic stress disorder. *Nat. Rev. Dis. Prim.* <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.57>
- Zampronio, A.R., Kuzmiski, J.B., Florence, C.M., Mulligan, S.J., Pittman, Q.J., 2010. Opposing actions of endothelin-1 on glutamatergic transmission onto vasopressin and oxytocin neurons in the supraoptic nucleus. *J Neurosci* 30, 16855–16863. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5079-10.2010>
- Zong, M.M., Zhou, Z.Q., Ji, M.H., Jia, M., Tang, H., Yang, J.J., 2019. Activation of β 2-Adrenoceptor Attenuates Sepsis-Induced Hippocampus-Dependent Cognitive Impairments by Reversing Neuroinflammation and Synaptic Abnormalities. *Front Cell Neurosci* 13, 293. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00293>
- Zou, S., Kumar, U., 2018. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>