

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

EMILY DA SILVA CÓRNEO

**MODULAÇÃO EPIGENÉTICA ATRAVÉS DO PROTOCOLO DE
ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL: EFEITO PROTETOR EM ANIMAIS
SUBMETIDOS A SEPSE**

**CRICIÚMA
2020**

EMILY DA SILVA CÓRNEO

**MODULAÇÃO EPIGENÉTICA ATRAVÉS DO PROTOCOLO DE
ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL: EFEITO PROTETOR EM ANIMAIS
SUBMETIDOS A SEPSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol

**CRICIÚMA
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C814m Córneo, Emily da Silva.

Modulação epigenética através do protocolo de enriquecimento ambiental : efeito protetor em animais submetidos a sepse / Emily da Silva Córneo. - 2020.

63 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2020.

Orientação: Felipe Dal-Pizzol.

1. Sepse. 2. Epigenética. 3. Enriquecimento ambiental. 4. Sepse - Fisiopatologia. 5. Encefalopatia séptica. 6. Sepse - Epidemiologia.
I. Título.

CDD 23. ed. 616.944

Bibliotecária Elisângela Just Steiner - CRB 14/1576
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 367

Com início às 09h (nove horas) do dia dois de outubro de 2020 (dois mil e vinte), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **EMILY DA SILVA CÓRNEO**, sob a orientação do **Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol** intitulada “**MODULAÇÃO EPIGENÉTICA ATRAVÉS DO PROTOCOLO DE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL: EFEITO PROTETOR EM ANIMAIS SUBMETIDOS A SEPSE**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Profa. Dra. Fabricia Petronilho (Universidade Federal do Sul de Santa Catarina - UNISUL) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 10h (dez horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador Adjunto do Programa. Criciúma, 02 (dois) de outubro de 2020 (dois mil e vinte).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador Adjunto do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo a resolução 07/2015 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Dedico essa dissertação ao meu avô Edemir Darella da Silva (*in memoriam*), que sempre apoiou minhas escolhas e não mediu esforços para ajudar na minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a minha família, em especial ao meu pai José Antônio, minha mãe Simone e ao meu irmão Pedro Antônio, que sempre acreditaram em mim e me ajudaram com tudo que estava ao seu alcance para que eu tivesse sempre o melhor. Além disso, aos meus avós que sempre se preocuparam comigo e me motivaram a nunca desistir dos meus sonhos e ir em busca dos meus objetivos.

Ao Pedro Henrique, que sempre esteve ao meu lado me apoiando, com certeza seu carinho e cuidado foram de extrema importância para eu ter chegado até aqui.

Agradeço ao meu orientador Dr. Felipe Dal-Pizzol, pelas oportunidades que tive nesses dois anos de mestrado e pela confiança que ele depositou em mim.

A todos os integrantes do laboratório de fisiopatologia experimental, em especial ao meu grupo de pesquisa, por terem me recebido tão bem, pelo conhecimento compartilhado e pelas amizades que adquiri nesse tempo, sou muito grata! Agradeço a Monique, pois ela foi essencial nesse trabalho, obrigada por toda ajuda, pelos ensinamentos e por sempre me ajudar quando eu precisei. A Mari, Andri, Amanda, Helo e Luana, pela amizade que construímos e pelas boas risadas. Ao Diogo, por toda ajuda, principalmente pela parceria nos testes comportamentais. Ao grupo BIOTECH, pelas oportunidades que já me deram e por todo apoio. E aos demais grupos de pesquisa que pude conhecer nesses anos na universidade.

A Deus, por ser meu alicerce, me guiar e por sempre me dar forças para continuar nos momentos difíceis.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para eu chegar até aqui o meu muito obrigada!

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

RESUMO

Sepse é definida como a presença de disfunção orgânica com grande risco à vida, resultante de uma resposta desregulada do organismo à infecção. A presença de estresse oxidativo e mediadores inflamatórios na sepsé leva à expressão gênica desregulada, que pode induzir uma resposta hiperinflamatória. A expressão gênica nas respostas inflamatórias é influenciada pela acessibilidade transcricional da cromatina, com modificações pós-traducionais das histonas determinando se os loci gênicos inflamatórios são definidos para estados transcricionalmente ativos, reprimidos ou equilibrados. Sendo que alterações na resposta de certos genes durante a sepsé estão relacionadas à progressão da doença. Sabe-se que condições ambientais possuem um papel importante em diversas patologias. Essas condições podem agir de forma negativa ou positiva, dependendo do estímulo que apresenta. Um ambiente considerado padrão pode oferecer estimulação sensorial e cognitiva reduzida, porém um ambiente enriquecido melhora o aprendizado espacial, evita déficits cognitivos induzidos pelo estresse da doença, como também é um importante modulador de enzimas epigenéticas. O presente estudo avaliou as alterações epigenéticas e os efeitos do protocolo de enriquecimento ambiental (EA) no cérebro de animais submetidos à sepsé por ligação e perfuração cecal (CLP). Primeiramente ratos *Wistar* machos foram divididos em grupos sham e CLP, sendo que os hipocampus foram removidos 24 horas, 72 horas, 10 dias e 30 dias após a sepsé para análise das enzimas epigenéticas: histona acetilase (HAT), histona desacetilase (HDAC) e DNA metiltransferase (DNMT). Depois disso um segundo experimento foi realizado, em que ratos *Wistar* machos foram novamente divididos em grupos sham e CLP e distribuídos em um ambiente padrão ou ao protocolo de EA, por quarenta e cinco dias. Após esse período foram feitos testes comportamentais, o hipocampo dos animais foi removido para avaliar a atividade das enzimas epigenéticas, para análises bioquímicas e de plasticidade sináptica. Não foram encontradas alterações significativas na atividade da HAT. Um aumento nas atividades de HDAC e DNMT foram observadas 72 horas, 10 dias e 30 dias após a sepsé. Houve uma correlação positiva das enzimas epigenéticas DNMT e HDAC nos tempos de 24 horas, 10 dias e 30 dias pós sepsé. Após o protocolo de EA, as atividades enzimáticas de HDAC e DNMT foram diminuídas, o comprometimento cognitivo foi revertido e os níveis de IL1- β foram diminuídos, além disso, ocorreu um aumento nos níveis de PSD-95 no hipocampo. Não houve alteração significativa nos níveis de sinaptofisina no tecido de hipocampo. Com isso, os resultados do presente estudo sugerem que intervenções em condições ambientais podem modular os resultados de consequências cognitivas de longo prazo associadas à sepsé, apoiando a ideia dos potenciais benefícios do EA.

Palavras-chave: Sepsé; epigenética; enriquecimento ambiental.

ABSTRACT

Sepsis is defined as the presence of life-threatening organ dysfunction resulting from an unregulated response by the body to infection. The presence of oxidative stress and inflammatory mediators in sepsis leads to unregulated gene expression, which can induce a hyperinflammatory response. Gene expression in inflammatory responses is influenced by the transcriptional accessibility of chromatin, with post-translational modifications of histones determining whether inflammatory gene loci are defined for transcriptionally active, repressed or balanced states. Changes in the response of certain genes during sepsis are related to disease progression. It is known that environmental conditions play an important role in several pathologies. These conditions can act in a negative or positive way, depending on the stimulus it presents. A standard environment may offer reduced sensory and cognitive stimulation, but an enriched environment improves spatial learning, avoids cognitive deficits induced by the stress of the disease, as well as being an important modulator of epigenetic enzymes. The present study evaluated the epigenetic changes and the effects of the environmental enrichment protocol (EE) on the brain of animals submitted to sepsis by ligation and perforation of the cecum (CLP). First male *Wistar* rats were divided into sham and CLP groups, and the hippocampus was removed 24 hours, 72 hours, 10 days and 30 days after sepsis for analysis of epigenetic enzymes: histone acetylase (HAT), histone deacetylase (HDAC) and DNA methyltransferase (DNMT). After that, a second experiment was carried out, in which male *Wistar* rats were again divided into sham and CLP groups and distributed in a standard environment or the EE protocol, for forty five days. After this period, behavioral tests were performed, the animals' hippocampus was removed to assess the activity of epigenetic enzymes, for biochemical and synaptic plasticity analyzes. No significant changes were found in HAT activity. An increase in HDAC and DNMT activities was observed 72 hours, 10 days and 30 days after sepsis. There was a positive correlation between epigenetic enzymes DNMT and HDAC at 24 hours, 10 days and 30 days after sepsis. After the EE protocol, HDAC and DNMT enzyme activities were decreased, cognitive impairment was reversed and IL1- β levels were decreased, in addition, there was an increase in PSD-95 levels in the hippocampus. There was no significant change in synaptophysin levels in the hippocampus. Thus, the results of the present study suggest that interventions in environmental conditions can modulate the results of long-term cognitive consequences associated with sepsis, supporting the idea of the potential benefits of EE.

Keywords: Sepsis; epigenetics; environmental enrichment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação do processo inflamatório na sepse.....	16
Figura 2: Representação de como ocorre uma metilação do DNA	19
Figura 3: Representação da acetilação e desacetilação de histonas.....	20
Figura 4: Esquema do modelo CLP	24
Figura 5: Condições ambientais de um ambiente padrão ou um ambiente enriquecido	25
Figura 6: Linha do tempo experimental, contendo datas da indução de sepse, eutanásia dos animais e estrutura retirada para dosagem.....	25
Figura 7: Linha do tempo do segundo experimento, contendo data da indução de sepse, testes comportamentais e estrutura retirada para dosagem	26
Figura 8: Grupos experimentais	27
Figura 9: Aparato para o teste de habituação em campo aberto.....	28
Figura 10: Aparato para avaliação do teste comportamental de reconhecimento de objetos.....	29
Figura 11: Atividade das enzimas epigenéticas HAT, HDAC e DNMT	32
Figura 12: Correlação das enzimas epigenéticas DNMT e HDAC.....	34
Figura 13: Efeitos do EA na atividade das enzimas epigenéticas no hipocampo de animais submetidos à sepse	35
Figura 14: Representação gráfica dos resultados do teste comportamental de atividade exploratória e locomotora após o protocolo de EA em animais submetidos à sepse.....	36
Figura 15: Representação gráfica dos resultados da tarefa de reconhecimento de objetos após o protocolo de EA em animais submetidos à sepse.....	36
Figura 16: Níveis de IL1- β no hipocampo após o protocolo EA em animais submetidos à sepse.....	37
Figura 17: Níveis de sinaptofisina no hipocampo após o protocolo de EA em animais submetidos à sepse	38
Figura 18: Níveis de PSD-95 no hipocampo após o protocolo de EA em animais submetidos à sepse	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância;
AP: Ambiente Padrão;
CEUA: Comissão de Ética de Uso em Animais;
CLP: Ligação e Perfuração Cecal (do inglês: *cecal ligation and puncture*);
CpG: Citosina Ligada a Guanina na Mesma Fita de DNA;
DATASUS: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde;
DMNT: DNA-metil Transferase;
DNA: Ácido Desoxirribonucleico;
EA: Enriquecimento Ambiental;
ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática;
EPM: Erro Padrão da Média;
ES: Encefalopatia Séptica;
HAT: Histona Acetilase;
HDAC: Histona Deacetilase;
IgG: Imunoglobulina G;
IL-1 β : Interleucina -1 β ;
IL-6: Interleucina 6;
ILAS: Instituto Latino Americano de Sepse;
IRAK: Quinase Associada ao Receptor IL-1;
LBP: Complexo de proteína de ligação ao LPS;
LPS: Lipopolissacarídeos;
MSR: Receptor Sequestrador de Macrófagos;
MyD88: Proteína de Diferenciação Mieloide 88;
NF-K β : Fator nuclear *Kappa* B;
PAMPs: Padrões Moleculares Associados aos Patógenos;
PBS: Tampão Fosfato Salina (do inglês: phosphate buffered saline);
RNA: Ácido ribonucleico;
RRP: Receptores de Reconhecimento de Padrão;
SDS: Dodecilsulfato de Sódio;

SDS-PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-dodecilsulfato de Sódio (do inglês: Extraction and polyacrylamide gels electrophoresis analysis);

SNC: Sistema Nervoso Central;

SOFA: Avaliação Sequencial de Falhas de Órgãos (do inglês: *Sequential Organ Failure Assessment*);

TGFb: Fator de Transformação de Crescimento Beta;

TIR: Domínio de Homologia do Receptor Toll / IL-1;

TIRAP: Proteína Adaptadora que contém o Domínio TIR;

TLR: Receptores Toll-Like;

TNF- α : fator de necrose tumoral α ;

Tollip: Proteína Adaptadora Inibitória dentro dos receptores Toll-like;

Tregs: Células T Reguladoras;

UTI: Unidade de Terapia Intensiva.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	DEFINIÇÃO DE SEPSE	15
1.2	EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.3	FISIOPATOLOGIA DA SEPSE.....	17
1.4	ENCEFALOPATIA SÉPTICA.....	19
2.	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	ANIMAIS	26
3.2	MODELO ANIMAL DE SEPSE.....	26
3.3	CONDIÇÕES AMBIENTAIS.....	27
3.4	DESENHO EXPERIMENTAL.....	28
3.5	ATIVIDADE DAS ENZIMAS HAT, HDAC E DNMT.....	30
3.6	TESTES COMPORTAMENTAIS	31
3.6.1	Habituação em Campo Aberto	31
3.6.2	Reconhecimento de objetos	31
3.7	NÍVEIS DE INTERLEUCINA.....	32
3.8	NÍVEIS DE PROTEÍNAS SINÁPTICAS	32
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4	RESULTADOS	34
4.1	ATIVIDADE DAS ENZIMAS EPIGENÉTICAS HAT, HDAC, DNMT	34
4.2	CORRELAÇÃO DAS ENZIMAS EPIGENÉTICAS DNMT E HDAC.....	35
4.3	ATIVIDADE DAS ENZIMAS EPIGENÉTICAS HAT, HDAC, DNMT EM DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS.....	37
4.4	TESTES COMPORTAMENTAIS	38
4.4.1	Habituação em Campo Aberto	38
4.4.2	Reconhecimento de Objetos	39
4.5	NÍVEIS DE INTERLEUCINA.....	40
4.6	NÍVEIS DE PROTEÍNAS SINÁPTICAS	40
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO	51
7	REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO DE SEPSE

De acordo com as novas definições sepse é caracterizada por ser uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção, sendo o choque séptico um quadro que apresenta acentuadas anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas associadas com maior risco de morte do que a sepse de forma isolada (Oviedo-Boyso et al., 2014; Font, Thyagarajan e Khanna, 2020). Nessa nova definição, alguns termos como septicemia, síndrome séptica e sepse grave foram colocadas em desuso (Seymour et al., 2016; Singer et al., 2016).

Essa doença possui um caráter complexo, podendo ser desencadeada a partir de diversos focos, organismos e acometer grupos heterogêneos de pacientes, apresentando idades diferentes, sinais e sintomas clínicos variados e diferentes perfis e históricos (Deutschman e Tracey, 2014). Com isso, a fim de padronizar a avaliação dessa disfunção orgânica, foi proposto que se utilizasse o escore SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) (Vincent e Korkut, 2008; Verdonk, Blet e Mebazaa, 2017). O SOFA expressa em valores numéricos o grau de comprometimento ou anormalidade na função de órgãos específicos, de acordo com alguns parâmetros medidos. Os critérios clínicos para que se defina sepse são: suspeita ou certeza de infecção e um aumento agudo de ≥ 2 pontos no escore SOFA em resposta a uma infecção (representando disfunção orgânica). Para choque séptico é necessário a presença de sepse acompanhada da necessidade de vasopressor para elevar a pressão arterial média acima de 65 mmHg e lactato > 2 mmol/L (18 mg/dL) após reanimação volêmica adequada (Abraham, 2016).

Essas novas definições foram publicadas na revista JAMA e apresentaram evidências científicas para a sua derivação e validação. Essa atualização se mostrou necessária devido ao maior número de recursos de suporte de vida disponíveis nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) atuais, especialmente em países desenvolvidos, e ao melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelas disfunções celulares e moleculares relacionadas à sepse e que contribuem para

morbidade e mortalidade associadas com essa síndrome (Taeb, Hooper e Marik, 2017; Cecconi et al., 2018; Napolitano, 2018).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

A sepse é uma das principais causas de mortalidade no mundo e um dos principais motivos de internação em UTI, sendo a principal geradora de custos nos setores públicos e privados (Quintano Neira et al., 2018). Essa disfunção orgânica é considerada uma das doenças mais fatais, levando ao aumento da incidência e prevalência dos casos (Bracht, Hafner e Weib, 2019).

A cada dia cerca de 24 mil pessoas morrem de sepse no mundo. Essa doença é responsável por uma perda anual de mais de oito milhões de vidas (Hall et al., 2011). O aumento no número de pacientes imunocomprometidos, uso frequente de antibióticos, aumento da expectativa de vida e o aumento da frequência de procedimentos invasivos estão entre os principais motivos para o aumento na incidência de sepse (Martin et al., 2003; Rangel-Frausto, 2005).

Uma revisão sistemática e meta-análise de Fleischmann et al. (2016) descreveu que a incidência global de sepse tratada em populações adultas em hospitais foi de 270 casos por 100.000 pessoas ao ano, e a mortalidade chegou em torno de 26% na última década. Com isso, sugere-se uma estimativa global de 19,4 milhões de casos de sepse e 5,3 milhões de mortes anualmente. Sendo de suma importância relatar que sobreviventes à sepse permanecem com maior risco de morte e um grande número deles ainda sofrem algum comprometimento físico e/ou neurocognitivo, transtornos do humor e baixa qualidade de vida (Angus e Poll, 2013).

Estudos epidemiológicos sobre sepse no Brasil são escassos. Segundo o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) em 2015 a mortalidade causada pela sepse em hospitais brasileiros privados foi de 34,5% e para hospitais públicos de 57,6% (Kauss et al., 2010). Uma pesquisa de 2017 acompanhou pacientes de 227 UTIs distribuídas em regiões brasileiras, sendo que dos 2632 internados, 794 desenvolveram sepse e desses 439 morreram no hospital. Com base na proporção de leitos de UTI ocupados por paciente (30,2%) a incidência de sepse foi estimada em 36,6 casos por 1000 pacientes-dia. Essas análises só ressaltam que a incidência e prevalência de sepse no Brasil são altas, que a mortalidade está entre as mais

elevadas do mundo, e que o resultado irá depender do acesso aos recursos oferecidos e a disponibilidade de tratamentos adequados (Moreno, Afonso e Fevereiro, 2006; Machado et al., 2017).

Além disso há preocupação no setor econômico, pois segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), o país gastou cerca de R\$ 400.387.078,76 no ano de 2015 com os pacientes sépticos, 110.049 pessoas foram internadas nesse período e a taxa de mortalidade foi de 45,3% (Miquelin e Reis, 2016). Sendo a condição mais cara tratada em hospitais, a sepse levou a um gasto de 20.3 bilhões de dólares, ou 5,2% do gasto total das hospitalizações dos Estados Unidos em 2011 (Torio e Andrews, 2013).

1.3 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

A fase inicial da sepse é impulsionada por citocinas e mediadores inflamatórios liberados pelo sistema imunológico inato, sendo que a mortalidade nesse período está relacionada com a ineficácia dos mecanismos de controle da resposta inflamatória (Venet, Rimmelé e Monneret, 2018). Durante a resposta do hospedeiro ao patógeno também há produção de mediadores anti-inflamatórios, na tentativa de manter o equilíbrio do sistema imune. Porém estudos mostram que esses mecanismos não restringem adequadamente o desenvolvimento da sepse, culminando em uma disfunção da resposta imune inata e adaptativa (Hunt, 2019; Nabzdyk et al., 2019). Dentre os principais aspectos estão a apoptose de linfócitos B e T, células dendríticas, macrófagos, grandes quantidades do fator de transformação de crescimento beta (TGF β) e aumento no número de células T reguladoras (Tregs). Devido a isso pacientes que sobrevivem a sepse tendem a desenvolver um quadro de imunossupressão, estando mais suscetíveis a infecções secundárias (Wakeley et al., 2020).

O processo inflamatório da sepse ocorre quando há proliferação de microrganismos e liberação de diversos compostos, como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos e exotoxinas, os quais podem também invadir a circulação sistêmica (Oviedo-Boyso et al., 2014).

A interação entre microrganismo e hospedeiro se inicia pelo reconhecimento das substâncias do agente etiológico, onde se podem destacar os

chamados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), estruturas moleculares não variáveis expressas por grupos de patógenos, as quais são normalmente significantes para a virulência e/ou sobrevivência do agente (Michels et al., 2020). Conforme a figura 1, os PAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão (RRP), sendo os mais comuns os receptores Toll-Like (TLR), os quais são expressos por células do sistema imune inato e podem ser encontrados em células dendríticas, macrófagos e neutrófilos (Hubacek et al., 2001; Flohé et al., 2006).

Após o reconhecimento, vias de transdução de sinal são ativadas, culminando na translocação do fator nuclear *Kappa* B (NF- κ B) para o núcleo celular. Com isso ocorre a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como interleucina 1- β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), os quais favorecem uma intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de granulócitos (Oviedo-Boyso et al., 2014). Esses mediadores são responsáveis pela reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória, gerando assim um ciclo vicioso inflamatório (Bone, 1991; Parrilo, 1993).

A liberação exacerbada de mediadores inflamatórios pode causar alterações hemodinâmicas, como extravasamento capilar, vasodilatação e redução do tônus do miocárdio, além de alterações na coagulação sanguínea (Mackenzie e Lever, 2007; Rittirsch, Hoesel e Ward, 2007; Nabzdyk et al., 2019). O desequilíbrio entre o consumo e a disponibilidade de oxigênio podendo levar ao quadro de hipóxia tecidual é uma característica que ocorre na sepse. Devido a priorização do oxigênio para áreas mais importantes, como cérebro e miocárdio, e pela própria patologia levar a um quadro inflamatório, ocorrem alterações na microcirculação (Steckert et al., 2013; Michels et al., 2020). O tempo de duração dessa situação pode levar a importantes alterações celulares e teciduais, desenvolvendo-se a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, dentre esses os mais afetados são cérebro, fígado, pulmão, rins e coração (Vincent e Korkut, 2008).

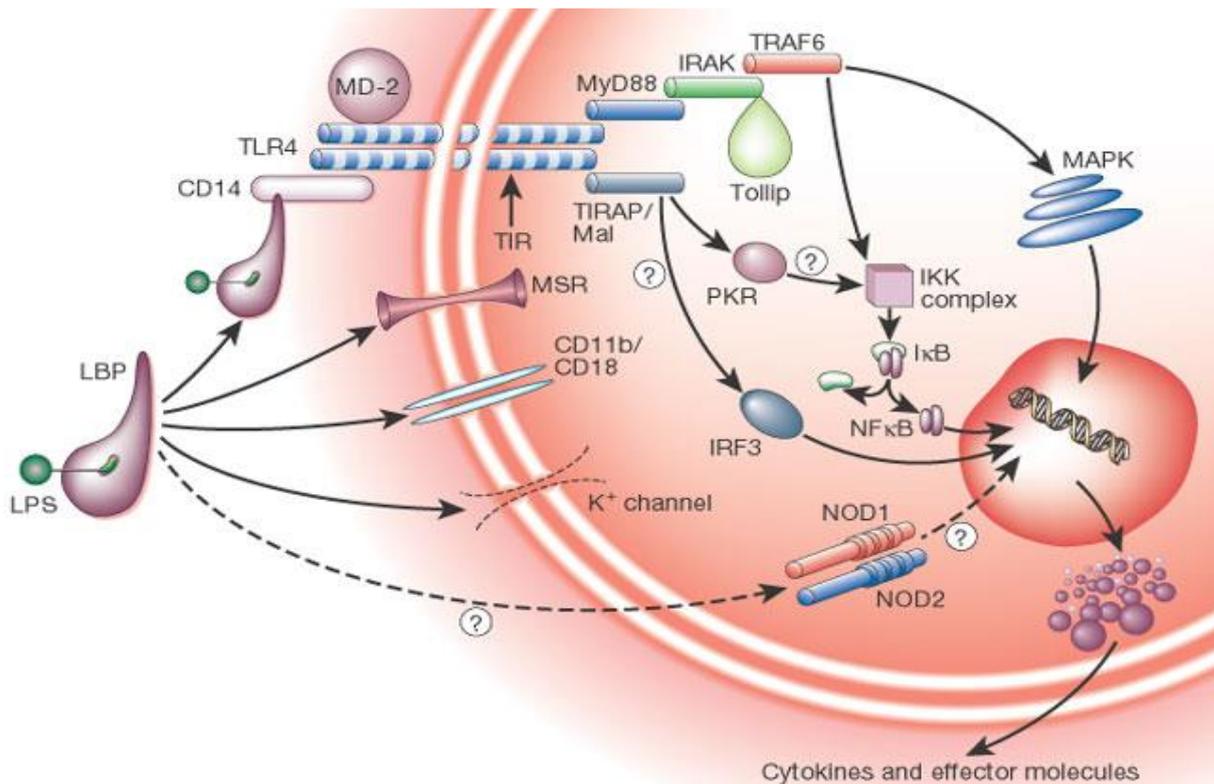


Figura 1: Representação do processo inflamatório na sepse. LPS sendo detectado através de um complexo de proteína de ligação (LBP) –LPS e, em seguida, sinalizando através do complexo TLR4 – MD-2. Outras moléculas da superfície celular também detectam LPS, como: receptor sequestrador de macrófagos (MSR), CD11b / CD18 e canais de íons. A sinalização intracelular depende da ligação do domínio TLR intracelular, TIR (domínio de homologia do receptor Toll / IL-1), ao IRAK (quinase associada ao receptor IL-1), MyD88 (proteína de diferenciação mieloide 88) e TIRAP (proteína adaptadora que contém o domínio TIR) e inibida pela proteína Tollip (Proteína Adaptadora Inibitória dentro dos receptores TLR). Também existe uma via independente de MyD88 e as células também podem responder ao LPS por receptores intracelulares chamados proteínas NOD. Fonte: Cohen J., 2002.

1.4 ENCEFALOPATIA SÉPTICA

O sistema nervoso central (SNC) é extremamente suscetível a diferentes fatores extra cerebrais, por isso é um dos primeiros sistemas a ser afetado durante a sepse (Robba, Crippa e Taccone, 2018). Cerca de 70% dos pacientes sépticos apresentam disfunção cerebral aguda, podendo levar a incapacidade cognitiva a longo prazo, incluindo alterações na memória, atenção e concentração (Iwashyna et al., 2010; Shah et al., 2013; Mazeraud et al., 2020). Estudos apontam que o estresse oxidativo, inflamação no hipocampo e ativação da micróglia, estão relacionados ao desenvolvimento da disfunção cognitiva após a sepse (Michels et al., 2014; Mina et al., 2014).

A encefalopatia séptica (ES) é decorrente de uma resposta sistêmica a uma inflamação, na ausência de infecção cerebral direta (Wu et al., 2013; Czerniawski e Guzowski, 2014). Mesmo ainda não compreendido totalmente os mecanismos dessa condição, estudos apontam que a redução do fluxo sanguíneo, alteração da barreira hematoencefálica e formação de edema cerebral são fatores que influenciam nessa disfunção (Ren et al., 2020). Esses acometimentos fazem com que a ES influencie negativamente na sobrevivência de pacientes sépticos, pois possui a capacidade de afetar vários sistemas, uma vez que o cérebro está envolvido no controle de diversos órgãos (Ziaja, 2012; Dal-Pizzol, Tomasi e Ritter, 2014).

Sabe-se que na sepse ocorre um aumento de mediadores inflamatórios nas células neurais, capazes de alterar o metabolismo celular. Esses mediadores podem induzir estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, resultando em alterações na neurotransmissão, e conseqüentemente levando ao quadro de ES (Messaris et al., 2004; Comim et al., 2008, 2010, 2011).

Estudos relatam que na fase aguda do modelo animal de sepse ocorre liberação exacerbada de citocinas pró inflamatórias no SNC. Esse aumento de citocinas gera uma disfunção cerebral, levando a alterações cognitivas como o prejuízo na memória e na aprendizagem, que são evidenciadas em um período de dez a trinta dias após a indução da sepse (Barichello et al, 2005; Comim et al., 2010). Já pesquisas clínicas expõem que pacientes sépticos apresentam níveis elevados de TNF- α e IL-1 β , como também de IL-6 no líquido cefalorraquidiano, confirmando que os mecanismos fisiopatológicos da ES podem ser o resultado de uma cascata de processos neuroinflamatórios (Zhang, Sheng e Yao, 2014; Liang et al., 2014).

A condição de ES costuma ser um evento precoce no decorrer da história natural da doença, surgindo frequentemente antes da disfunção dos demais órgãos, e associada a um pior prognóstico, quando presente (Prescott e Angus, 2018; Ren et al., 2020). A ES está relacionada à alta mortalidade hospitalar, porém os que sobrevivem podem apresentar comprometimentos persistentes graves, como limitações funcionais (incapacidade de tomar banho de forma independente), cognitivas e de saúde mental (ansiedade, depressão ou transtorno de estresse pós-traumático) (Iwashyna et al., 2010; Griton et al., 2020).

1.5 EPIGENÉTICA NA SEPSE

O estudo de Waddington em 1942 descreveu algumas das características gerais de um epigenótipo, onde se constatou que fatores ambientais estressores poderiam causar manifestações de fenótipos não esperados, e esses novos fenótipos eram transmitidos para as gerações seguintes, mesmo quando cessavam os fatores ambientais estressores (Waddington, 2011). Já em 1987 o termo epigenética foi aplicado em situações nas quais as mudanças na metilação também mudaram a atividade do gene, sendo este um grande passo para o interesse da pesquisa por epigenética (Holliday, 1987; Holliday, 2006).

A definição de epigenética pode se dar como o estudo de mudanças na expressão genética, que não ocorrem em função de alterações em sequências de bases nucleotídicas do ácido desoxirribonucleico (DNA), mas de alterações específicas na expressão de alguns genes, por alterações na cromatina por exemplo, e das substâncias que são produzidas a partir das suas informações (Hassan et al., 2018; Binnie et al., 2020a). Devido a isso o epigenoma é dinâmico e varia de célula para célula dentro de um mesmo organismo multicelular (Tsankova et al., 2007; Cross et al., 2019).

Os mecanismos epigenéticos são considerados parâmetros flexíveis, capazes de serem alterados em face de diversos estímulos, como as mudanças no ambiente, estresse e alimentação. Sendo assim, alterações epigenéticas podem ser desencadeadas no genoma de um indivíduo em qualquer momento de sua vida (Egger et al., 2004; Mehler, 2008). Falhas no estabelecimento ou manutenção das marcas epigenéticas também podem resultar na ativação ou inibição imprópria de vários genes, e alterar a fisiologia celular normal levando ao desenvolvimento de patologias (Vachharajani e McCall, 2019).

As regulações epigenéticas estão relacionadas aos estados dinâmicos da cromatina, que variam entre eucromatina (aberta) e heterocromatina (condensada), sendo elas as alterações nas histonas e no padrão de metilação do DNA. Estes mecanismos são capazes de alterar a acessibilidade da cromatina para que consigam intervir na regulação da transcrição localmente ou globalmente (Dozmorov et al., 2013; Hassan et al., 2018; Binnie et al., 2020a).

As principais enzimas relacionadas a alterações epigenéticas são DNA-metil transferase (DNMT), Histona deacetilase (HDAC) e Histona acetilase (HAT). A DNMT é responsável por realizar a metilação do DNA, que ocorre normalmente nas regiões promotoras nas quais a citosina está unida a uma guanina por ligação fosfodiéster na mesma fita de DNA, denominadas ilhas CpG (citosina ligada a guanina na mesma fita de DNA). Esse mecanismo consiste na substituição de um átomo de hidrogênio por radical metil, que é adicionado covalentemente na posição 5 do anel de uma citosina como ilustra a figura 2 (Bird, 2002; Davis et al., 2019).

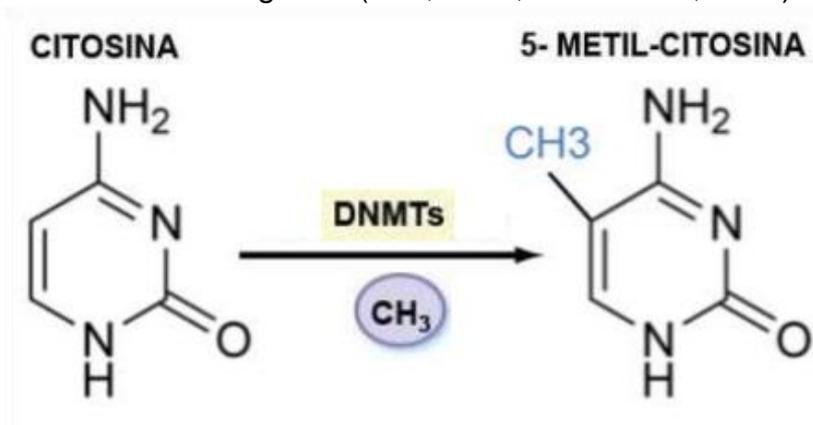


Figura 2: Representação de como ocorre uma metilação do DNA. Fonte: Bird; 2002.

A metilação do DNA pode atuar no controle da expressão gênica já que é capaz de bloquear o sítio promotor do acesso dos fatores de transcrição, fazendo uma hipermetilação nessas regiões. Tal mecanismo causa o silenciamento do alelo metilado, impedindo que a enzima RNA-polimerase se ligue a molécula (Miranda e Jones, 2007).

Dentre as alterações de histonas a acetilação é a mais bem descrita, sendo catalisada pela HAT que adiciona grupos acetila, sendo HDAC a responsável pela remoção desses grupos (figura 3). A acetilação de histonas está associada com o aumento da atividade gênica, conseqüentemente elevando a acessibilidade dos fatores transcripcionais por deixar a cromatina em formato de eucromatina (Ciarlo, Savva e Roger, 2013). De forma reversa, a ação das histonas deacetilases faz com que a cromatina adquira uma nova estrutura conformacional, de heterocromatina, que desfavorece a iniciação transricional (Cross et al., 2019).

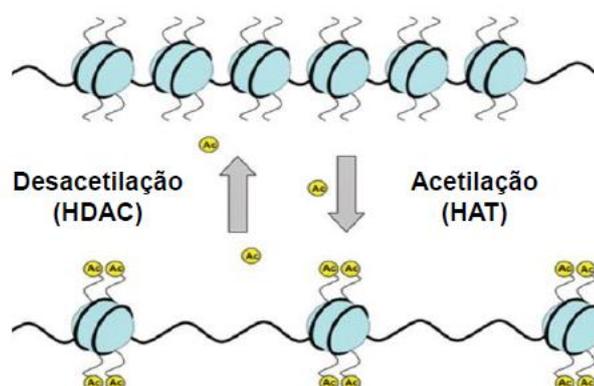


Figura 3: Representação da acetilação e desacetilação de histonas. Fonte: Eslaminejad, Fani e Shahhoseini, 2013.

Os mecanismos epigenéticos como a acetilação de histonas, modulam a expressão de citocinas pró- inflamatórias, determinam o fenótipo celular e podem ser responsáveis por adaptações moleculares dinâmicas do SNC aos estressores (Mehler, 2008; Elliott et al., 2010; Stankiewicz, et al., 2013). Devido a isso, a área da epigenética é importante para o desenvolvimento do sistema imune e a função efetora, bem como a aparente correlação entre a cronicidade da doença e a regulação dos genes inflamatórios, fazendo com que o papel dos mecanismos epigenéticos na fisiopatologia da sepse seja relevante (Unternaehrer et al., 2012; Fang et al., 2014).

1.6 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

As condições ambientais possuem um papel fundamental no desempenho cognitivo de diversas doenças neuropsiquiátricas afetando de forma positiva ou negativa, dependendo do estímulo que esse ambiente oferece e são consideradas fatores que tem a capacidade de modular os mecanismos epigenéticos (Lehmann e Herkenham, 2011; Volkens e Scherder, 2011). O ambiente considerado padrão é aquele que oferece uma estimulação sensorial e cognitiva reduzida, já o caracterizado enriquecido é definido como um ambiente que apresenta estímulos físicos e sociais (Fuchs et al., 2016; Kempermann, 2019; Kaneko et al., 2020).

A resposta comportamental e neuroendócrina alterada de forma negativa é vista em um ambiente padrão (Volkens e Scherder, 2011; Birch e Kelly, 2019). Evidências mostram que pacientes internados nas UTIs estão sujeitos a esse ambiente, podendo apresentar efeitos negativos no desempenho cognitivo (Caruso et

al., 2014; Jackson et al., 2014; Wintermann et al., 2015). Entretanto um ambiente enriquecido pode melhorar a aprendizagem espacial, diminuir a mortalidade e prevenir os déficits cognitivos induzidos pelo estresse de certa patologia (Fuchs et al., 2016; Ohline e Abraham, 2019).

No intuito de defender essas hipóteses, estudos atuais em animais mostram que algumas das anormalidades neurocognitivas induzidas pela administração de LPS podem persistir em um ambiente padrão, mas são melhoradas por um ambiente enriquecido (Brod et al., 2017; Ji et al., 2017). Essas alternâncias neurocognitivas foram acompanhadas por alterações significativas nos biomarcadores da resposta imune e da plasticidade sináptica do hipocampo, sendo que o ambiente enriquecido levou a um maior número de neurônios, sinapses e produção de fatores neurotróficos quando comparados com os animais sujeitos ao ambiente padrão (Winocur, 1998; Leger et al., 2015; Ji et al., 2017; Takai et al., 2019). Com isso entende-se que os efeitos das condições ambientais na função cognitiva são reversíveis, com melhora no desempenho cognitivo quando os animais são regidos a um ambiente enriquecido (Ji et al., 2017).

1.7 JUSTIFICATIVA

As modificações epigenéticas podem fornecer informações mecanicistas sobre a ocorrência e o tratamento de doenças, mas pouco se sabe sobre esses mecanismos durante o desenvolvimento de sepse no cérebro. Por isso o papel dos mecanismos epigenéticos na fisiopatologia da sepse se faz importante, mostrando a necessidade de investigar em que momento estas alterações ocorrem e como se comportam durante a progressão da doença. Sabe-se que condições ambientais podem modular os resultados de consequências cognitivas de longo prazo associadas à sepse, como também ser um importante modulador de enzimas epigenéticas, apoiando a ideia dos potenciais benefícios de um ambiente enriquecido e alertando para os efeitos colaterais de fatores ambientais adversos na função cognitiva.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a modulação epigenética através do enriquecimento ambiental para estimular a melhora cognitiva em animais submetidos a um modelo de sepse.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar a atividade da enzima HAT 24 horas, 72 horas, 10 dias e 30 dias após os ratos *Wistar* adultos serem submetidos a sepse ou sham.
- Mensurar a atividade da enzima HDAC 24 horas, 72 horas, 10 dias e 30 dias após os ratos *Wistar* adultos serem submetidos a sepse ou sham.
- Mensurar a atividade da enzima DNMT 24 horas, 72 horas, 10 dias e 30 dias após os ratos *Wistar* adultos serem submetidos a sepse ou sham.
- Avaliar os parâmetros comportamentais através dos testes de habituação em campo aberto e reconhecimento de objetos em ratos *Wistar* adultos submetidos a diferentes condições ambientais 45 dias após sepse.
- Mensurar a atividade das enzimas HAT, HDAC e DNMT em ratos *Wistar* adultos submetidos a diferentes condições ambientais 45 dias após sepse.
- Quantificar níveis de IL-1 β no hipocampo de ratos *Wistar* adultos submetidos a diferentes condições ambientais 45 dias após sepse.
- Avaliar os níveis de PSD-95 e sinaptofisina no hipocampo de ratos *Wistar* adultos submetidos a diferentes condições ambientais 45 dias após sepse.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A utilização dos animais seguiu um protocolo experimental que foi submetido para a Comissão de Ética de Uso em Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, com o número de protocolo de aprovação: 006/ 2019-1(anexo A) e 088/2019-1 (anexo B).

3.1 ANIMAIS

O estudo foi dividido em dois experimentos. Foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos, pesando entre 200-300g, fornecidos pelo Centro de Experimentação Animal da UNESC. Os ratos foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas (7:00 as 19:00h) a uma temperatura entre 18 e 22°C, umidade relativa entre 55 e 65%. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento, foram manipulados por pessoas qualificadas, evitando dores e estresse desnecessários. Ao final dos experimentos, os animais foram submetidos a eutanásia pelo método de decapitação sob condições prescritas pelo comitê de ética.

3.2 MODELO ANIMAL DE SEPSE

O modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP) (do inglês: *cecal ligation and puncture*), consiste em ligação e perfuração do ceco (Brooks et al., 2007). Ele é o que mais se assemelha ao quadro de sepse em humanos, pois tem a capacidade de induzir danos cognitivos através da infecção causada ao perfurar o ceco dos animais. Com isso é um dos modelos mais aceitos para mimetizar a presença de sepse.

Os animais foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal. O ceco foi ligado abaixo da junção íleo-cecal com fio seda 3-0 e perfurado com uma agulha número 14, levemente comprimindo até a extrusão do conteúdo fecal. Os planos cirúrgicos foram fechados e os ratos observados por 2 horas (figura 4). Todos os grupos receberam suporte básico (salina em 50 ml/kg imediatamente e 12 horas após CLP) e ceftriaxona (30 mg/kg a cada 6 horas). Todos os animais receberam antibióticos (ceftriaxona a 30 mg/kg) e dipirona (80 mg/kg) a cada 6 horas subcutâneo por 3 dias. A mortalidade desse modelo é cerca de 40%.

Nos grupos sham os animais foram submetidos apenas a laparotomia e exposição do ceco, sem perfuração e extravasamento. Já os animais do grupo CLP receberam as mesmas manipulações realizadas no grupo sham, porém com perfuração e extravasamento do conteúdo fecal.

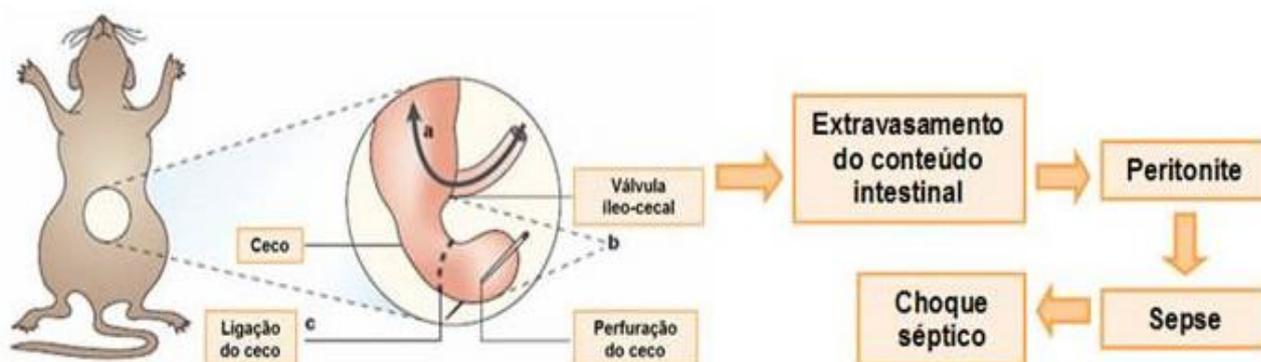


Figura 4: Esquema do modelo CLP: Laparotomia abdominal, exposição do intestino, ligação do ceco, perfuração cecal, extravasamento das fezes, levando a peritonite e sepse. Fonte: Adaptado de Buras, Holzmann e Sitkovsky; 2005.

3.3 CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Após a recuperação da cirurgia de indução de sepse (48 horas), os animais foram distribuídos aleatoriamente em duas condições ambientais diferentes: ambiente padrão ou ambiente enriquecido e mantidos nessas condições de habitação por quarenta e cinco dias. O ambiente padrão consiste em alojamento comum de gaiola (41 cm x 34 cm x 18 cm), já o ambiente enriquecido consiste em gaiolas maiores (80 cm x 45 cm x 22 cm) contendo uma pequena casa e uma roda de corrida para exercício voluntário e brinquedos que foram alterados três vezes por semana com brinquedos novos de diferentes formas e cores (figura 5). Para o ambiente padrão os animais ficaram agrupados em um número (n^0) de cinco por caixa (Ji et al., 2017).

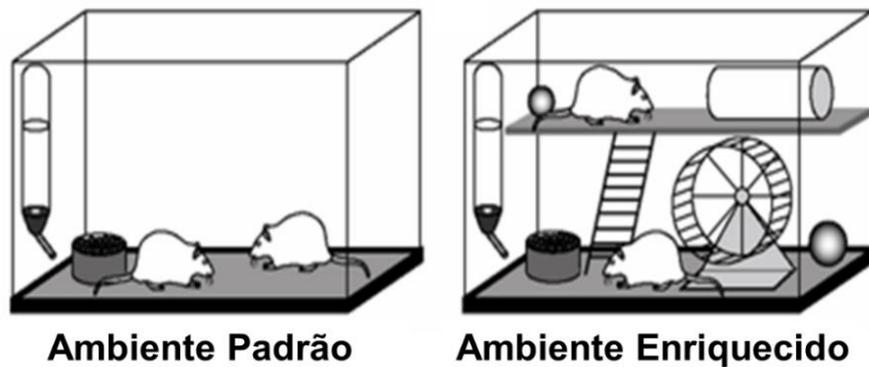


Figura 5: Condições ambientais de um ambiente padrão ou um ambiente enriquecido. Fonte: Adaptado de Leger et al., 2015.

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

A primeira parte do experimento foi realizado com 80 ratos *Wistar*, que foram divididos em oito grupos, sendo que em cada grupo a eutanásia dos animais foi realizada em um tempo diferente, a fim de analisar as alterações epigenéticas. Os grupos foram: 1) Sham 24 horas ($n^{\circ}=7$); 2) CLP 24 horas ($n^{\circ}=13$); 3) Sham 72 horas ($n^{\circ}=7$); 4) CLP 72 horas ($n^{\circ}=13$); 5) Sham 10 dias ($n^{\circ}=7$); 6) CLP 10 dias ($n^{\circ}=13$); 7) Sham 30 dias ($n^{\circ}=7$); 8) CLP 30 dias ($n^{\circ}=13$) (figura 6).

Conforme o tempo delimitado em cada grupo, a eutanásia dos animais foi feita por decapitação e foi retirado o hipocampo para a análise da atividade das enzimas HAT, HDAC e DNMT.

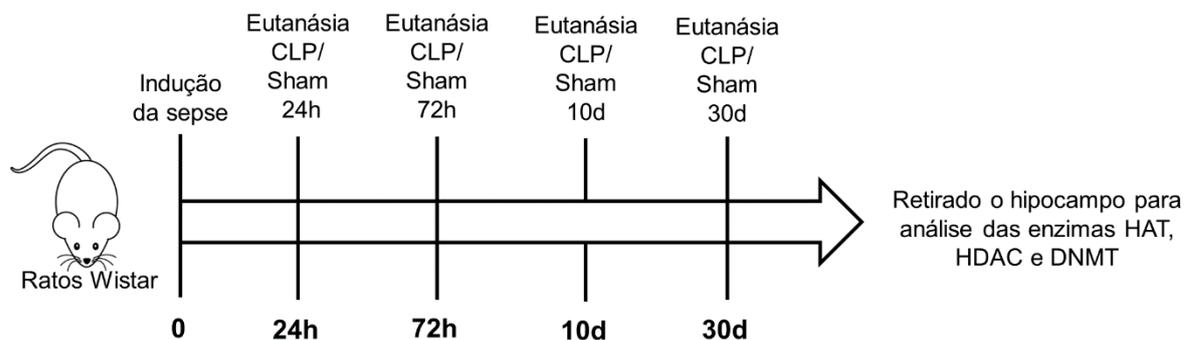


Figura 6: Linha do tempo experimental, contendo datas da indução de sepse, eutanásia dos animais e estrutura retirada para dosagem. Fonte: Autora, 2020.

Após o término da primeira etapa com a análise da atividade das enzimas epigenéticas, foi feito o segundo experimento, onde foram utilizados 46 ratos *Wistar*, divididos em quatro grupos: 1) Sham + Ambiente Enriquecido ($n^{\circ}=7$); 2) Sham + Ambiente Padrão ($n^{\circ}=7$); 3) CLP + Ambiente Enriquecido ($n^{\circ}=16$); 4) CLP + Ambiente Padrão ($n^{\circ}=16$). Os grupos sham e CLP foram submetidos aos mesmos procedimentos que o primeiro experimento. Após 48 horas, os animais foram distribuídos em um ambiente padrão ou ambiente enriquecido e mantidos nessas condições de habitação por quarenta e cinco dias. Após esse período os animais foram submetidos a testes comportamentais e por fim foi feita a eutanásia pelo método de decapitação e retirou-se o hipocampo para posteriores análises neuroquímicas e imunológicas (figura 7), sendo elucidado melhor através do fluxograma que exemplifica as etapas dos dois experimentos (figura 8).

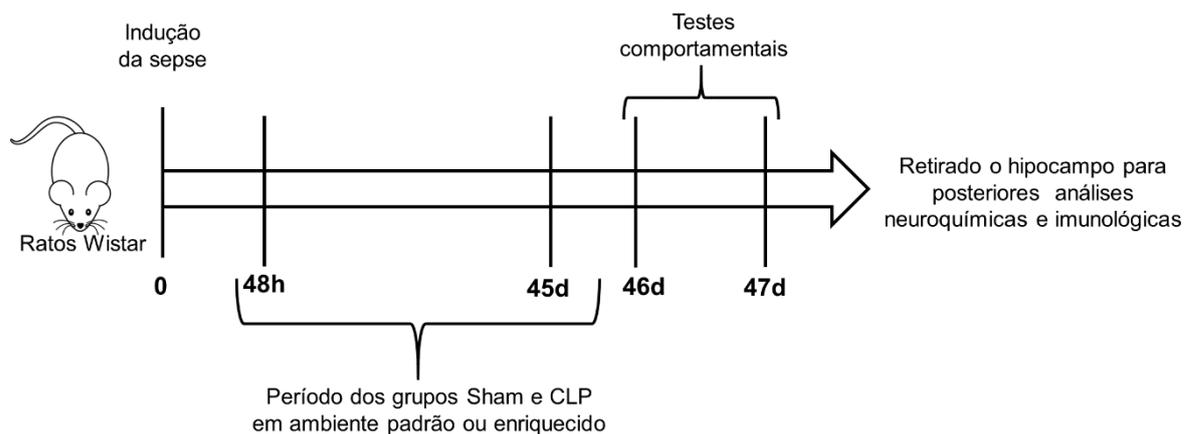


Figura 7: Linha do tempo do segundo experimento, contendo data da indução de sepse, testes comportamentais e estrutura retirada para dosagem. Fonte: Autora, 2020.

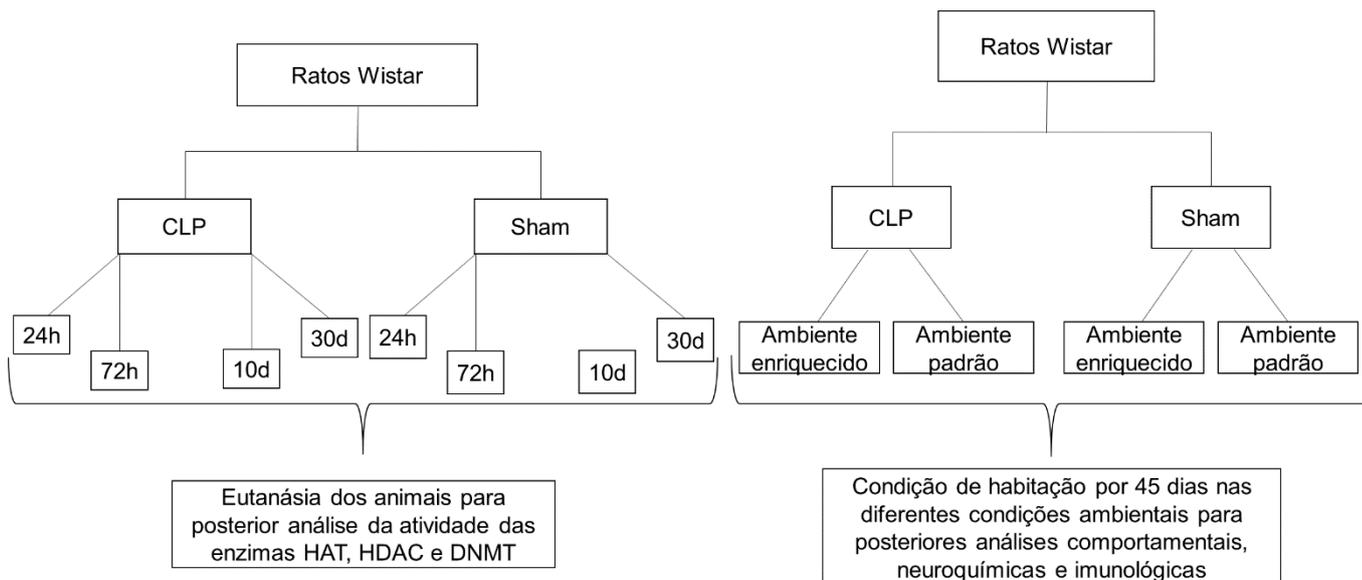


Figura 8: Grupos experimentais. Fonte: Autora, 2020.

3.5 ATIVIDADE DAS ENZIMAS HAT, HDAC E DNMT

As amostras obtidas foram congeladas e armazenadas a -80°C até a extração das proteínas nucleares. As amostras de hipocampo foram submetidas a um protocolo de extração nuclear usando um kit de extração nuclear comercial (Chemicon, EUA).

Os extratos nucleares foram submetidos a um ensaio para avaliação da atividade de HAT, HDAC e DNMT utilizando kit de ensaio de detecção colorimétrica, conforme as instruções do fabricante (Epigentek cod. HAT P- 4003-96; HDAC P-4002-96; DNMT P-3001-2). Uma curva padrão foi realizada com diluições em série de substratos de cada kit e controles positivos e negativos foram adicionados à placa. A leitura colorimétrica foi realizada em um leitor de placas ELISA (do inglês Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay). O cálculo da atividade das enzimas foi realizado com base na curva padrão, e os valores foram apresentados em $\text{nM} / \mu\text{g}$ de proteína. As dosagens de proteína foram determinadas pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951) e a albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.6.1 Habituação em Campo Aberto

O procedimento foi realizado em um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo três de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas conforme a figura 9. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorará livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após os animais voltam para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repete o procedimento do treino. Os números de cruzamentos (crossings) através das linhas pretas e o número de levantamentos (rearings) foram avaliados em ambas sessões (Vianna et al., 2000).

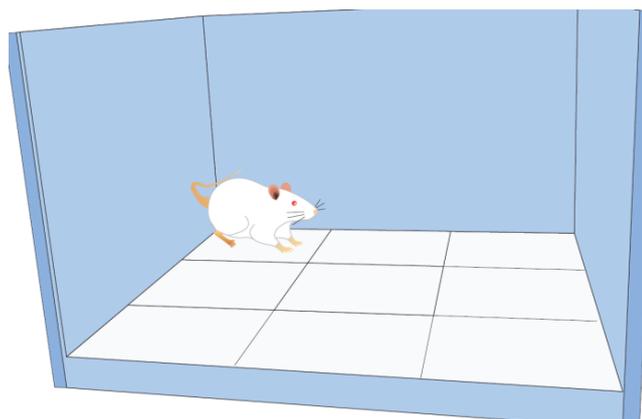


Figura 9: Aparato para o teste de habituação em campo aberto. Fonte: Laboratório de Fisiopatologia Experimental, desenvolvida por Allan Collodel, 2017.

3.6.2 Reconhecimento de objetos

A tarefa de reconhecimento de objetos é um teste comportamental utilizado para avaliar memória de longa duração. Os ratos foram submetidos à sessão de treino por 5 minutos onde foram expostos a dois objetos idênticos na arena de treinamento, um campo aberto com dimensões de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura. Foi cronometrado o tempo gasto explorando os objetos A e B (forma, tamanho e cor iguais). A sessão de teste foi feita no dia seguinte e foi trocado o objeto B pelo objeto C (diferente do objeto A), contando-se assim o tempo de exploração de cada objeto (De Lima, 2005). A premissa do teste é que os ratos devam passar mais

tempo explorando o objeto novo, que é desconhecido, ao invés do objeto familiar. A exploração de objetos foi medida usando dois cronômetros para registrar o tempo gasto explorando os objetos durante as sessões experimentais e a exploração foi definida como: cheirar ou tocar o objeto com o nariz. Um "índice de reconhecimento" foi calculado como expresso pela equação $TB / (TA + TB)$, sendo: TA = tempo gasto explorando o objeto familiar e TB = tempo gasto explorando o objeto novo (figura 10).

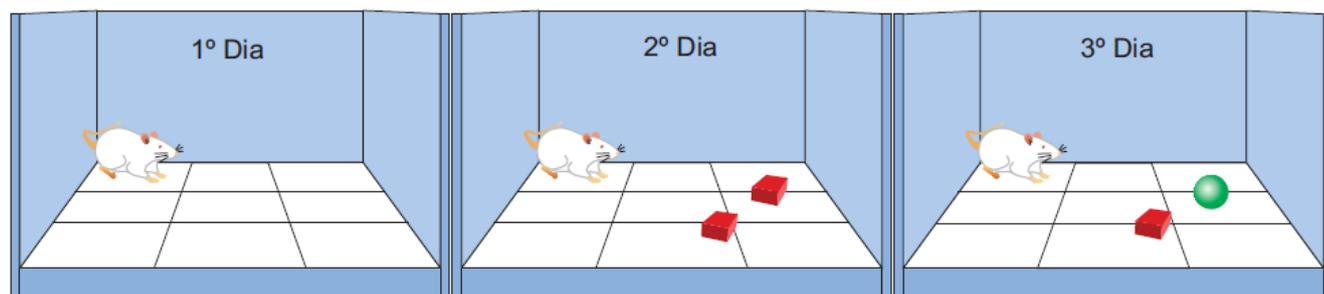


Figura 10: Aparato para avaliação do teste comportamental de reconhecimento de objetos. Fonte: Laboratório de Fisiopatologia Experimental, desenvolvida por Allan Collodel, 2017.

3.7 NÍVEIS DE INTERLEUCINA

Os níveis de IL-1 β foram determinados no hipocampo através do kit comercial de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Wood et al., 2019). As amostras de hipocampo foram homogeneizadas em tampão fosfato salina (PBS). Foi adicionado primeiramente o diluente em cada poço e posteriormente a amostra, padrão ou controle. Em seguida, a placa foi coberta e incubada por duas horas a temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas com tampão de lavagem. A IL-1 β foi acrescentada em cada poço e novamente incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Depois de lavadas, foi adicionada solução substrato em cada poço e incubada por mais 30 minutos a temperatura ambiente. Depois da incubação, foi adicionada solução *stop* para parar a reação. A densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 450 nm.

3.8 NÍVEIS DE PROTEÍNAS SINÁPTICAS

Os níveis de sinaptofisina (um marcador específico de vesículas sinápticas que desempenha um papel importante na liberação de neurotransmissores) foram determinados no hipocampo através do kit comercial de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Wood et al., 2019). Já os níveis de PSD-95, uma proteína

estrutural de sinapse altamente estável (Xie et al., 2019), foram analisados em amostras de hipocampo. As amostras foram homogeneizadas em tampão Laemmli (TrisHCl 62,5 mM, pH 6,8, 1% (p / v) de dodecilsulfato de sódio (SDS), 10% (v / v) de glicerol) e quantidades iguais de proteína (30 µg / poço) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e transferidas eletricamente para as membranas de nitrocelulose. A eficiência da transferência eletrônica foi verificada por coloração com Ponceau, e a membrana foi então bloqueada em solução salina tampão Tris-Tween (TTBS: Tris HCl 100 mM, pH 7,5, contendo NaCl a 0,9% e Tween 20 a 0,1%) com albumina a 5%. As membranas foram incubadas durante a noite a 4 °C com coelho monoclonal anti-PSD-95 (1: 1000). A IgG (imunoglobulina G) anti-coelho secundária foi incubada com a membrana por 2 horas (1: 10000). A imunorreatividade foi detectada por quimioluminescência utilizando ECL. A análise densitométrica dos filmes foi realizada no software ImageJ v.1.34. Todos os resultados foram expressos como uma razão relativa entre anti-PSD-95 e GAPDH.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do teste comportamental de habituação em campo aberto foram avaliados através da média e o erro padrão da média (EPM), sendo EPM a diferença estatística calculada através do teste T student para amostras independentes. Para o teste de reconhecimento de objetos os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil e as diferenças entre treino e teste foram avaliadas pelo teste U de Mann-Whitney seguido pelo teste de Wilcoxon.

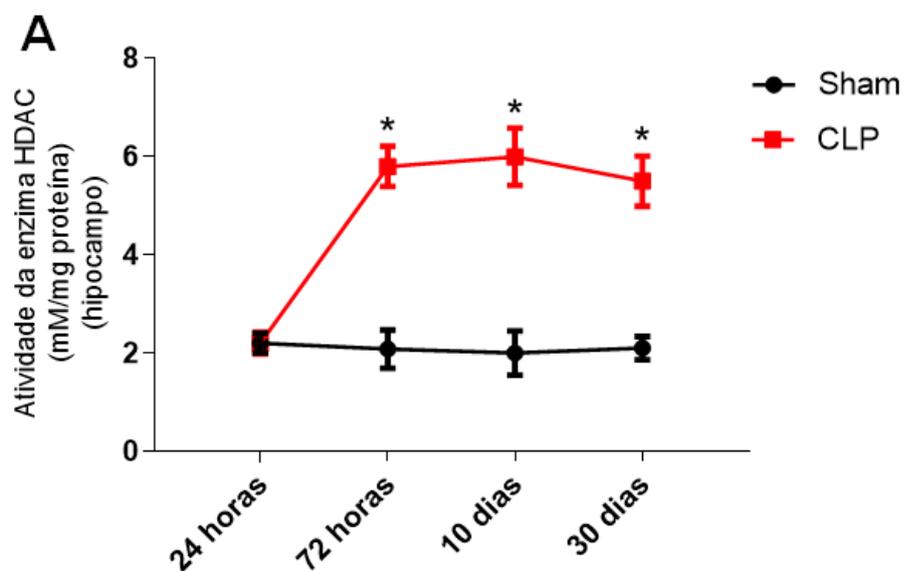
Para as análises bioquímicas e imunológicas, os dados foram expressos em média ± desvio padrão e comparadas com análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Tukey. Para a correlação das enzimas epigenéticas os dados foram expressos através do coeficiente de correlação de Pearson, levando em consideração o valor de “r”. Western blotting foi quantificado pelo programa ImageJ® e apresentado como razão entre proteína e GAPDH. Todos os testes foram analisados no programa SPSS versão 20 e/ou GraphPad Prism 5.0. Em todas as análises foi adotado como nível para significância estatística um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE DAS ENZIMAS EPIGENÉTICAS HAT, HDAC, DNMT

A atividade das enzimas epigenéticas foi avaliada no hipocampo de animais submetidos à sepse. As enzimas HDAC e HAT se associam à desacetilação e acetilação de histonas, respectivamente. Com relação a atividade da HDAC, não houve diferença significativa 24 horas após a sepse. Entretanto a partir de 72 horas ocorreu um aumento, e se manteve elevado até o período de 30 dias após a sepse na atividade dessa enzima quando comparado o grupo séptico ao grupo sham, no hipocampo desses animais (Figura 11A). Já com relação a enzima HAT, não foram observadas alterações significativas na sua atividade em nenhum momento (Figura 11B).

A enzima que é associada com a metilação do DNA é a DNMT. Com relação a essa enzima, não houve uma diferença significativa na sua atividade 24 horas após a sepse. Porém a partir de 72 horas ocorreu um aumento na sua atividade no hipocampo, e se manteve elevado até o período de 30 dias após a sepse, quando comparado o grupo séptico ao grupo sham (Figura 11C).



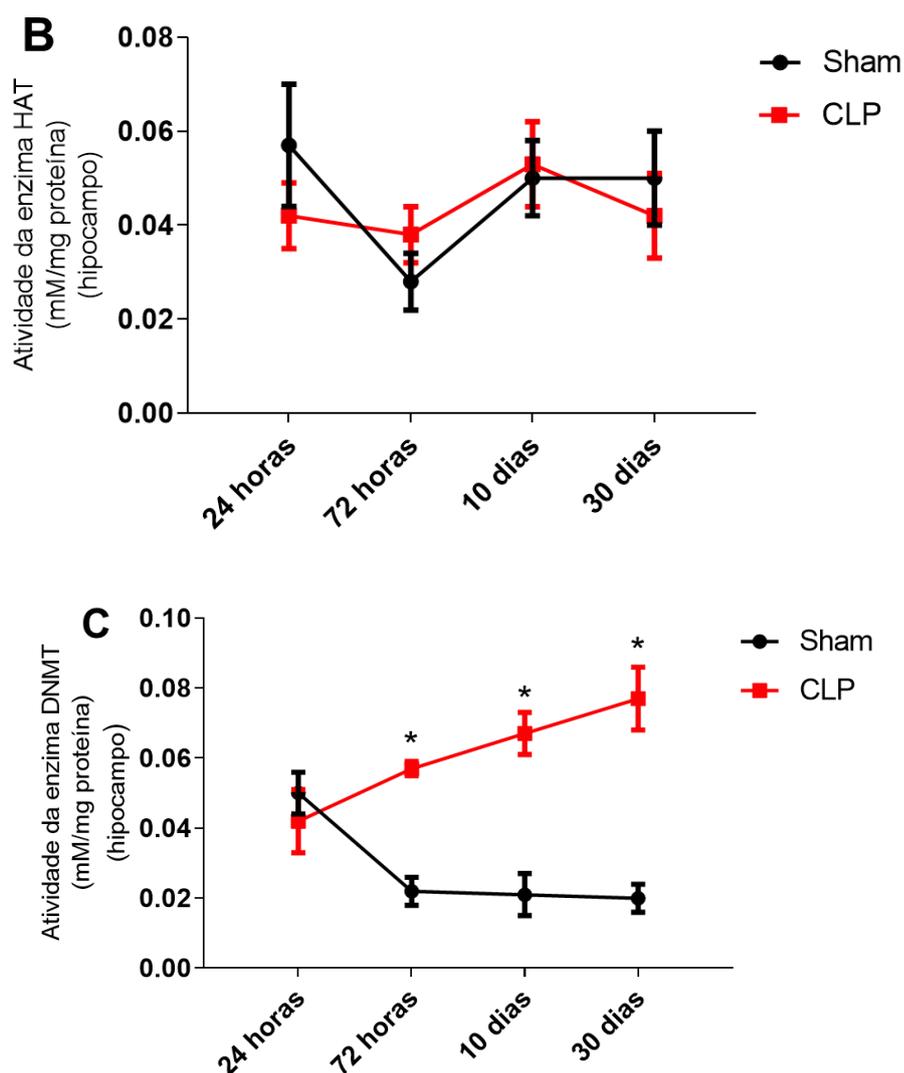
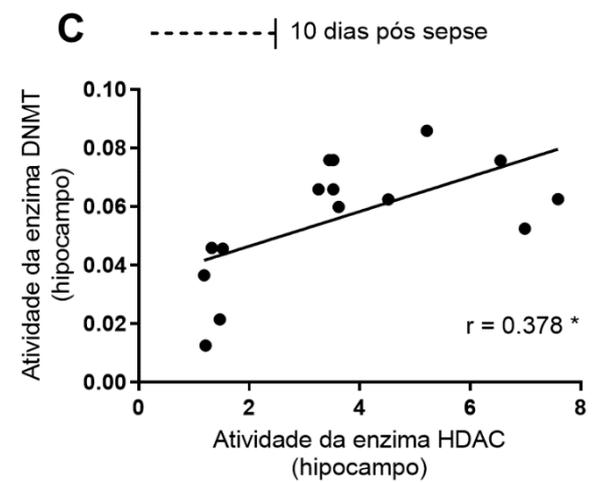
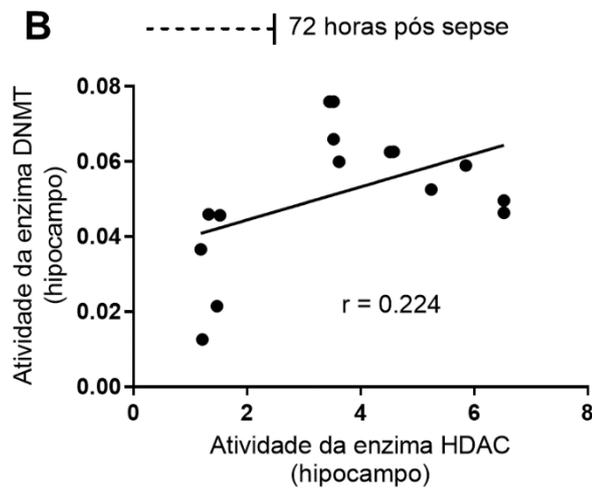
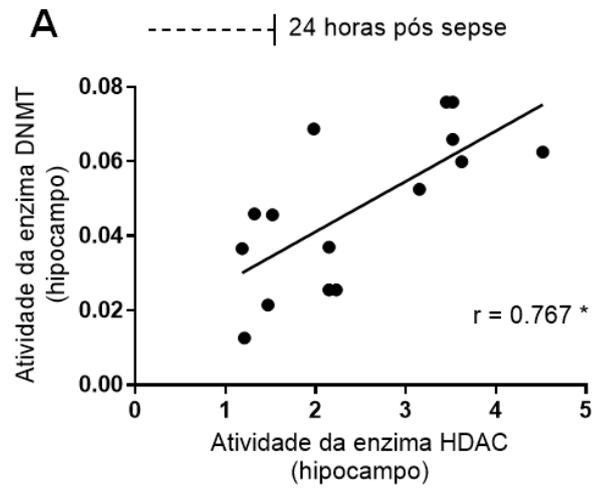


Figura 11: Atividade das enzimas epigenéticas HAT, HDAC e DNMT. As atividades de HDAC, HAT e DNMT foram medidas no hipocampo de animais submetidos à sepse em diferentes tempos. HDAC (A); HAT (B) e DNMT (C). Os dados são expressos como média \pm DP e comparadas com análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. $n^{\circ}=6$ cada grupo. * $p < 0,05$ diferente do CLP ao mesmo tempo.

4.2 CORRELAÇÃO DAS ENZIMAS EPIGENÉTICAS DNMT E HDAC

A correlação da atividade das enzimas epigenéticas DNMT e HDAC foi avaliada no hipocampo de animais submetidos à sepse. Entende-se que a enzima DNMT está relacionada com a metilação do DNA e a enzima HDAC com modificações na cromatina, sendo que esses fatores possuem interação entre si. Percebeu-se que nos tempos de 24 horas (12A), 10 dias (12C), e 30 dias (12D), a atividade das duas enzimas apresentou uma correlação significativamente positiva. Porém, o tempo de 72 horas (12 B), apresentou uma correlação porem não de forma significativa.



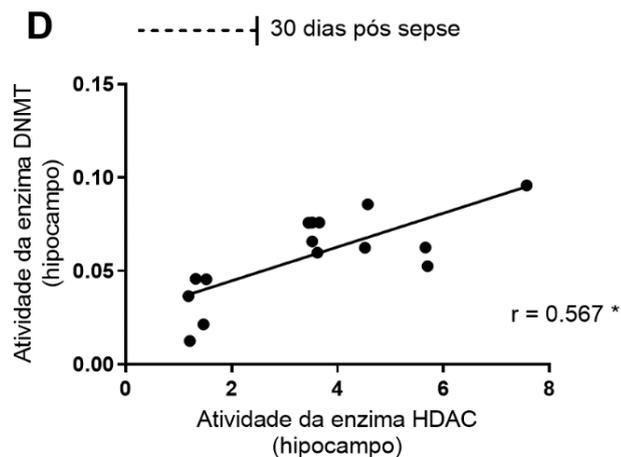
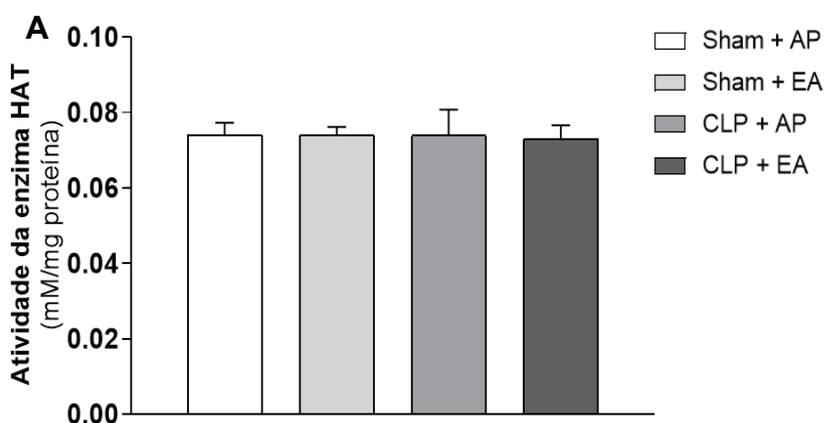


Figura 12: Correlação da atividade das enzimas epigenéticas DNMT e HDAC no hipocampo de animais submetidos à sepse. As atividades de DNMT e HDAC foram correlacionadas no tecido de hipocampo de animais submetidos à sepse em diferentes tempos. 24 horas (A); 72 horas (B) 10 dias (C); 30 dias (D). Os dados são expressos através do coeficiente de correlação de Pearson, levando em consideração o valor de “r” e $p < 0,05$.

4.3 ATIVIDADE DAS ENZIMAS EPIGENÉTICAS HAT, HDAC, DNMT EM DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Os efeitos do enriquecimento ambiental (EA) na atividade das enzimas epigenéticas foram avaliados no hipocampo de animais submetidos à sepse. Após o protocolo de EA não foram observadas alterações na atividade da enzima HAT (Figura 13A). As enzimas HDAC e DNMT tiveram um aumento significativo na sua atividade no grupo CLP + ambiente padrão, quando comparado ao grupo sham. Porém, a atividade dessas duas enzimas diminuiu significativamente no grupo CLP + EA quando comparado ao grupo CLP + ambiente padrão, mostrando que o protocolo de EA reverte as alterações geradas pela sepse (Figuras 13B e 13C).



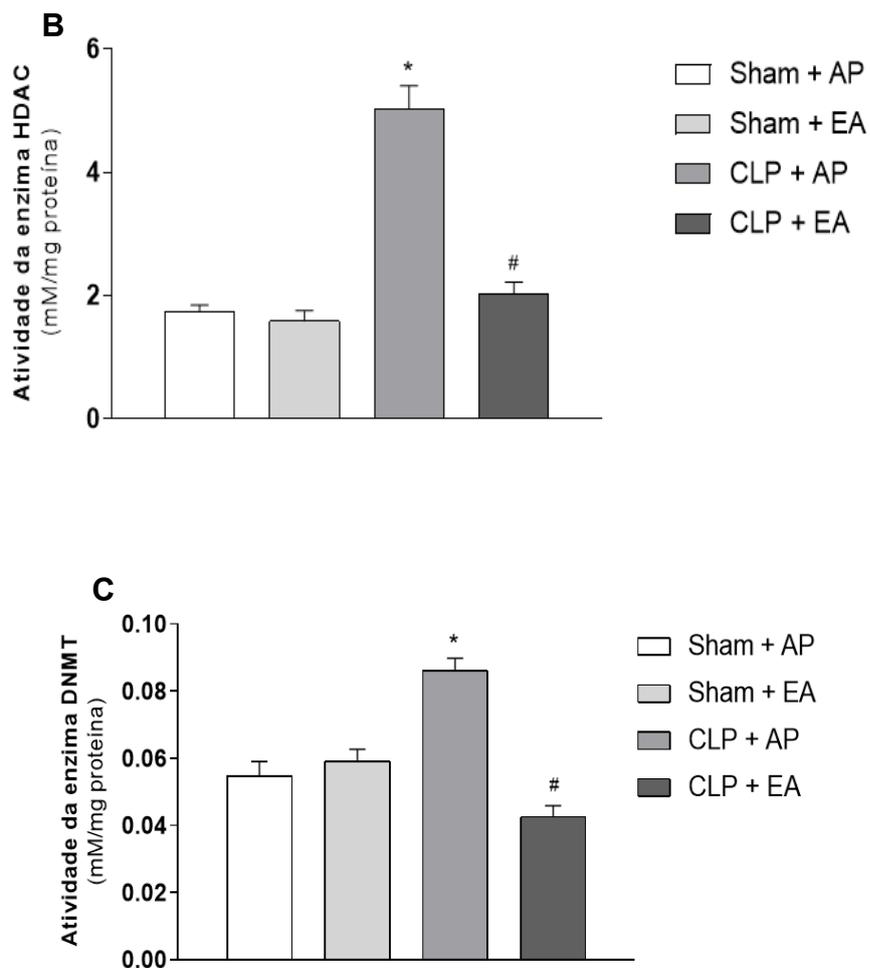


Figura 13: Efeitos do EA na atividade das enzimas epigenéticas no hipocampo de animais submetidos à sepse. As atividades de HDAC, HAT e DNMT foram medidas no hipocampo de animais submetidos à sepse após protocolo de EA (período de 40 dias). HAT (A); HDAC (B) e DNMT (C). Os dados foram expressos como média \pm DP e comparadas com análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. $n^{\circ}=6$ cada grupo. * $p<0,05$ versus sham + AP; # $p<0,05$ versus CLP + AP. EA: enriquecimento ambiental; AP: ambiente padrão.

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.4.1 Habituação em Campo Aberto

No intuito de avaliar a memória de habituação e o comprometimento cognitivo dos animais, foi realizado o teste de habituação em campo aberto. O grupo CLP + ambiente padrão apresentou prejuízo cognitivo, pois não foi observado uma diferença significativa entre o treino e teste na atividade exploratória (*rearing*) e locomotora (*crossing*). Porém o grupo CLP + EA apresentou uma diferença significativa entre o treino e o teste, demonstrando uma melhora na memória de

habituação, confirmando sua capacidade em reverter as alterações geradas pela sepse (Figura 14).

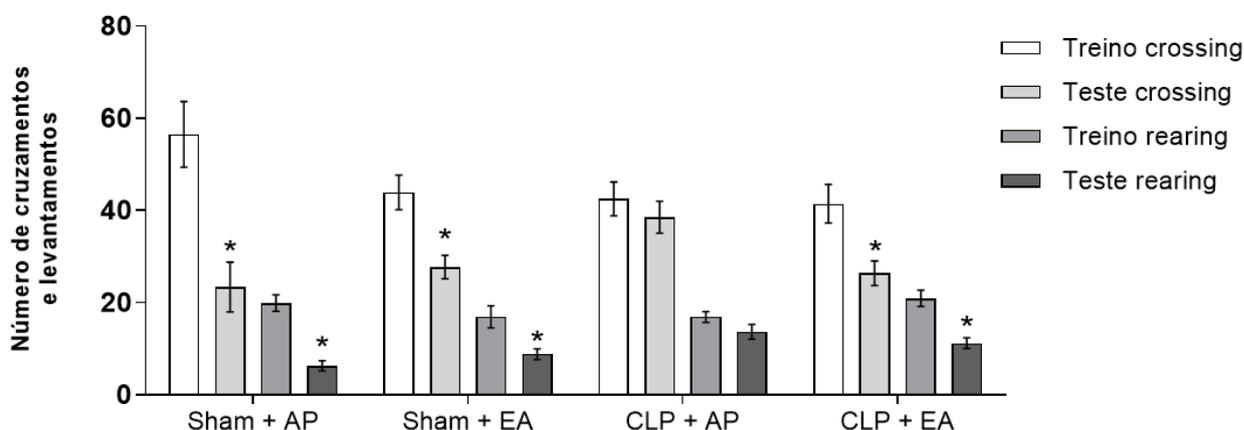


Figura 14: Representação gráfica dos resultados do teste comportamental de atividade exploratória e locomotora após o protocolo de EA em animais submetidos à sepse. As barras representam média \pm EPM sendo a diferença estatística calculada através do teste T student para amostras independentes. $n^{\circ}=10$ cada grupo. * $p < 0,05$ quando comparados o teste versus treino de seu próprio grupo. EA: enriquecimento ambiental; AP: ambiente padrão.

4.4.2 Reconhecimento de Objetos

Para explorar ainda mais o potencial efeito protetor do protocolo de EA foi realizado a tarefa de reconhecimento de objetos, utilizada para avaliar a memória de longa duração. O grupo CLP + ambiente padrão apresentou um déficit de memória, pois não apresentaram maior latência permanecendo explorando o novo objeto. Contudo, o grupo CLP + EA apresentou uma diferença significativa no índice de reconhecimento de objetos entre treino e teste, manifestando uma memória de longa duração e confirmando sua capacidade em reverter as alterações geradas pela sepse (Figura 15).

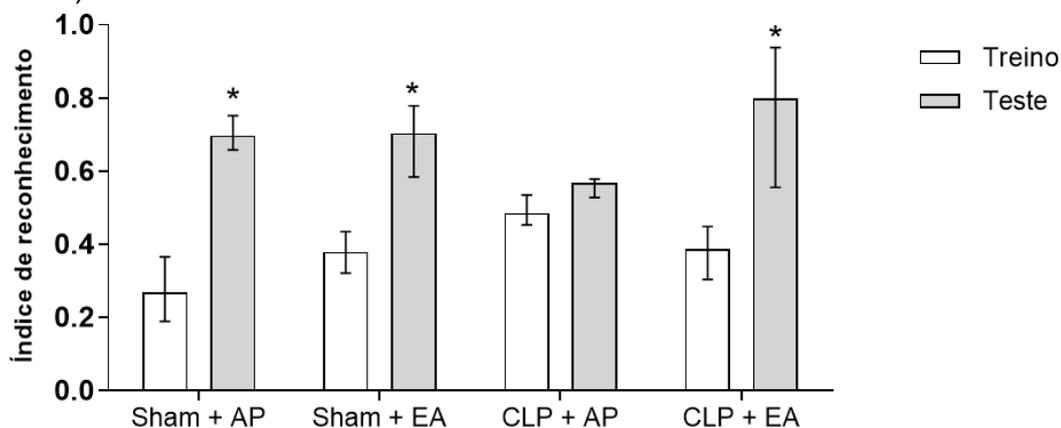


Figura 15: Representação gráfica dos resultados da tarefa de reconhecimento de objetos após o protocolo de EA em animais submetidos à sepse. O índice de reconhecimento é apresentado como mediana e intervalos interquartis. As diferenças entre treino e teste foram avaliadas pelo teste U de

Mann-Whitney seguido pelo teste de Wilcoxon. $n^{\circ}=10$ cada grupo. * $p < 0,05$ quando comparados o teste versus treino de seu próprio grupo. EA: enriquecimento ambiental; AP: ambiente padrão.

4.5 NÍVEIS DE INTERLEUCINA

Sabe-se que a inflamação está relacionada com a fisiopatologia da sepse e para melhor elucidar os resultados obtidos nos testes comportamentais, foram avaliados os níveis da citocina IL-1 β no tecido cerebral de hipocampo.

Os níveis de IL-1 β foram analisados no hipocampo após o protocolo de EA em animais submetidos à sepse. O grupo CLP + ambiente padrão demonstrou níveis elevados de IL-1 β em comparação ao grupo sham + AP e ao grupo sham + EA. Porém os animais sépticos que foram submetidos ao protocolo de EA tiveram uma diminuição significativa nos níveis de IL-1 β (Figura 16).

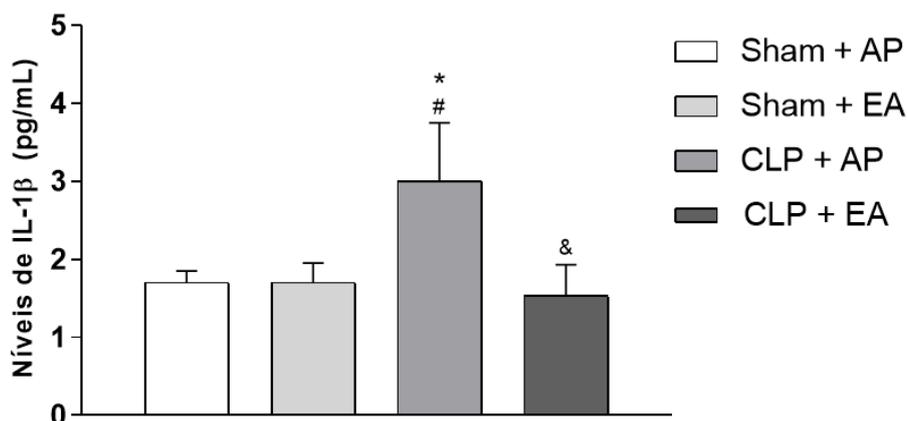


Figura 16: Níveis de IL-1 β no hipocampo após o protocolo EA em animais submetidos à sepse. Os níveis de IL-1 β foram medidos no final do protocolo EA no hipocampo de animais submetidos à sepse. Os dados foram expressos como média \pm DP e comparadas com análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. $n^{\circ}=6$ cada grupo. * $p < 0,05$ diferente de sham + AP; # $p < 0,05$ diferente de sham + EA; & $p < 0,05$ diferente de CLP + AP. EA: enriquecimento ambiental; AP: ambiente padrão.

4.6 NÍVEIS DE PROTEÍNAS SINÁPTICAS

A sinaptofisina é considerada um marcador específico de vesículas sinápticas, que desempenha um papel importante na liberação de neurotransmissores. Não ocorreu alterações significativas nos níveis de sinaptofisina em nenhum dos grupos analisados após o protocolo de EA em animais submetidos à sepse. (Figura 17).

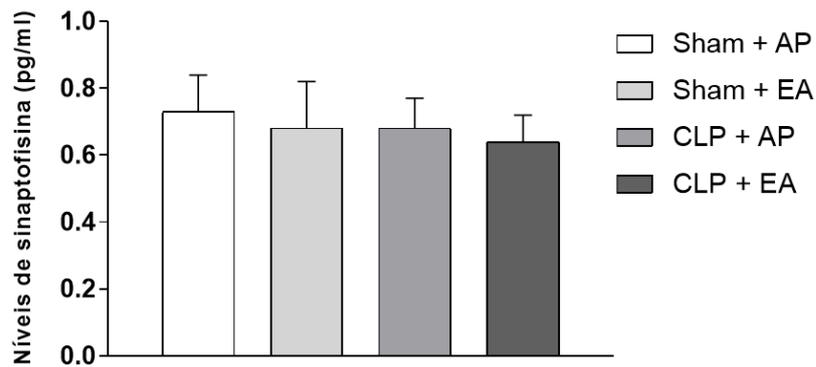


Figura 17: Níveis de sinaptofisina no hipocampo após o protocolo de EA em animais submetidos à sepse. Os níveis de sinaptofisina foram medidos no final do protocolo de EA no hipocampo de animais submetidos à sepse. Os dados foram expressos como média \pm DP e comparadas com análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. $n^{\circ}=6$ cada grupo. * $p < 0,05$ diferente de sham + AP; # $p < 0,05$ diferente de CLP + AP. EA: enriquecimento ambiental; AP: ambiente padrão.

Para determinar o efeito do protocolo de EA na plasticidade sináptica foi avaliado uma proteína estrutural de sinapse altamente estável, também conhecida como PSD-95. O grupo CLP + ambiente padrão apresentou uma diminuição nos níveis de PSD-95 comparado ao grupo Sham + ambiente padrão. Entretanto, o protocolo de EA foi capaz de aumentar os níveis de PSD-95 no hipocampo de animais submetidos à sepse (Figura 18).

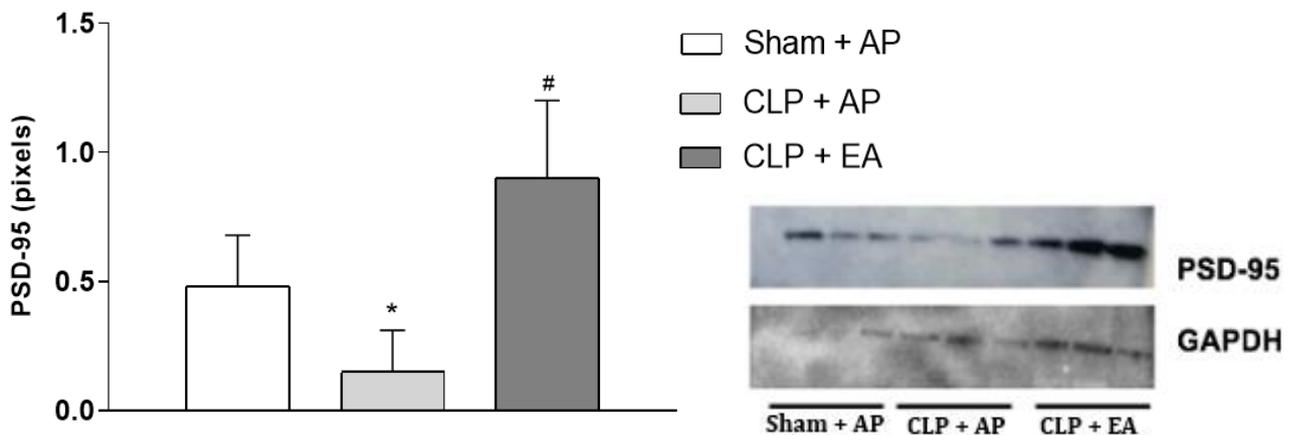


Figura 18: Níveis de PSD-95 no hipocampo após o protocolo de EA em animais submetidos à sepse. Os níveis de PSD-95 foram medidos no final do protocolo de EA no hipocampo de animais submetidos à sepse. Os dados foram expressos como média \pm DP e comparadas com análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. $n^{\circ}=6$ cada grupo. * $p < 0,05$ diferente de sham + AP; # diferente de CLP + AP. EA: enriquecimento ambiental; AP: ambiente padrão.

5 DISCUSSÃO

Este estudo teve a finalidade de relatar a presença de alterações epigenéticas em um modelo animal de sepse, primeiramente em diferentes tempos e posteriormente apresentou que a exposição a um protocolo de EA é capaz de reduzir essas alterações e diminuir os déficits gerados pela fisiopatologia da sepse.

Pesquisas recentes revelam como insultos por estresse oxidativo e eventos inflamatórios gerados pela sepse, podem levar à vulnerabilidade da expressão de certos genes e alterações epigenéticas, bem como a imunossupressão (Ren et al., 2020). Sabe-se que os mecanismos epigenéticos mais elucidados na literatura, são responsáveis por determinam o fenótipo celular, mas também podem ser responsáveis por adaptações moleculares dinâmicas do SNC aos estressores (Stankiewicz et al., 2013; Hassan et al., 2018).

O início da fisiopatologia da sepse consiste na invasão do hospedeiro por um patógeno, sendo que muitos deles, incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas, usam mecanismos epigenéticos para manipular a resposta do hospedeiro à infecção, favorecendo assim sua própria sobrevivência (Salomão et al., 2019; Font, Thyagarajan e Khanna, 2020). Devido a isso, uma das marcas da supressão imunológica associada à sepse é a tolerância ao patógeno, uma falha do sistema imunológico inato na tentativa de reagir as respostas provocadas pelo causador da doença (Dal-Pizzol et al., 2014; Schwalm et al., 2014; Hunt, 2019).

Sabe-se que as enzimas epigenéticas que estão relacionadas à modificação de histonas são conhecidas como HATs e HDACs, mais especificamente acetilação e desacetilação dessas proteínas. Numerosas enzimas atuam juntas para adicionar ou remover modificações covalentes em histonas, interagindo entre si e com outros mecanismos para manter a conformação da cromatina e o controle da transcrição (Ciarlo, Savva e Roger, 2013). Já as enzimas DNMTs, são responsáveis pela metilação do DNA, atuando na substituição da citosina H5 do DNA por um grupo metil. Com isso, essa metilação do gene leva a inibição da transcrição e conseqüentemente se relaciona ao silenciamento gênico, além de levar a uma instabilidade cromossômica (Bird, 2002; Binnie et al., 2020a). Sabe-se que quando ocorre uma hipometilação ou hipermetilação, verifica-se um desequilíbrio na

expressão gênica, levando a consequências importantes como a apoptose de células e a inflamação exacerbada (Davis et al., 2019).

Neste presente estudo, não houve diferença entre os grupos na atividade da enzima epigenética HAT. No entanto, mudanças nas atividades das enzimas HDAC e DNMT foram observadas, mostrando um aumento significativo em suas atividades a partir de 72 horas até 30 dias no grupo de animais sépticos quando comparado ao grupo sham. Esses resultados sugerem alterações na transcrição genética em modelo animal de sepse, principalmente relacionadas ao silenciamento da expressão gênica por até 30 dias, sendo que esse fator também está relacionado ao comprometimento cognitivo gerado pela doença (Hassan et al., 2018; Cross et al., 2019; Davis et al., 2019). Além disso, o fato da enzima HAT não ter apresentado diferença significativa na sua atividade, não é considerado necessariamente um fator ruim, pois esse comportamento pode ser uma consequência da elevada atividade evidenciada na enzima HDAC nos animais sépticos, algo suficiente para elucidar que ocorreu alteração nas histonas (Vachharajani e McCall, 2019).

Pesquisas *in vitro* sugerem que as modificações epigenéticas são fundamentais para o estabelecimento da tolerância gerada ao patógeno. Um estudo de El Gazzar et al. (2008) mostrou que monócitos em repouso apresentam o promotor TNF metilado, ou seja, transcricionalmente inativo. Porém após exposição a uma endotoxina, ocorre a rápida desmetilação do promotor TNF, resultando no reposicionamento dos nucleossomos e na exposição de um sítio de ligação ao NF- κ B. Porém à medida que as células progredem a tolerância à endotoxina, pode ocorrer o recrutamento de enzimas DNMTs, gerando um evento de “remetilação”, consequentemente tornando o promotor TNF não mais sensível à estimulação pela endotoxina.

Estudos relatam que em doenças autoimunes, no câncer e em distúrbios neurológicos, várias alterações epigenéticas são evidenciadas e associadas ao aparecimento ou agravamento dessas patologias (Hewagama e Richardson, 2009; Cross et al., 2019). Uma pesquisa de Silva e Jasiulionis (2014) descreve que o estresse oxidativo e a epigenética estão intimamente conectados com processos de progressão tumoral, sendo cruciais nas etapas iniciais da doença. Além disso, pesquisas evidenciam o envolvimento de mudanças epigenéticas no direcionamento

do fenótipo de macrófago, bem como na função das células dendríticas durante a sepse (Wen et al., 2008; Tian, Meng e Zhang, 2017; Wu, Li e Ji, 2017).

A regulação epigenética de produtos gênicos ocorre por meio de vários mecanismos, mas pode ser generalizada como a organização regulada de loci gênicos em estados transcricionalmente ativos ou silenciosos (Dozmorov et al., 2013; Cole et al., 2016). Conforme um estudo apresentado por Warford et al. (2017), autópsias de cérebros de pacientes com sepse mostraram uma expressão aumentada da enzima epigenética HDAC. Sabe-se que em condições fisiológicas, as atividades das enzimas HAT e HDAC são bem equilibradas, porém isso acaba sendo alterado no início da sepse. Devido a uma expressão avassaladora de mediadores pró-inflamatórios no decorrer dessa doença, há necessidade da enzima HAT abrir a estrutura da cromatina para ocorrer a transcrição efetiva de genes pró-inflamatórios, como IL-1 β , uma citocina considerada um marcador precoce da sepse, que está envolvida nas alterações cognitivas geradas por essa patologia (Alamdari et al., 2010; Mina et al., 2014), e isso é corroborado pelos resultados do presente estudo. Notavelmente, esse processo é neutralizado pelas enzimas HDACs, que são em parte induzidas e ativadas por compostos bacterianos, levando a uma reconstituição da cromatina intimamente ligada ao silenciamento gênico (Eskandarian et al., 2013; Ciarlo et al., 2016) e que conseqüentemente está associado à imunossupressão (Carson et al., 2011; Hassan et al., 2018).

Um estudo de Wen et al. (2008) mostrou que as alterações epigenéticas nas histonas estão envolvidas no padrão de expressão gênica de longo prazo nas células dendríticas, e que elas contribuem para a imunossupressão observada em animais pós-sepse e em pacientes com sepse grave. Essas alterações nas histonas também são implicadas no desenvolvimento das respostas imunes adquiridas, especialmente na diferenciação e manutenção de células de memória Th1/Th2 (Ansel et al., 2006).

A uniformização da acetilação de histonas pelas enzimas HDACs e HATs é fundamental para a regulação transcricional requerida para a plasticidade sináptica e processos de memória (Ciarlo, Savva e Roger, 2013; Fang et al., 2014). Evidências comprovam que HDACs desempenham um papel fundamental na sobrevivência neuronal e que estão envolvidas em vários modelos de doenças

neurodegenerativas. Além disso, as enzimas HDACs estão associadas na aprendizagem e modulação de memória (Jiang et al., 2008). Um estudo de Guan et al. (2009) mostrou que camundongos que expressavam HDAC2 tinham memória espacial comprometida, sugerindo que a formação da memória e a plasticidade sináptica foram negativamente reguladas por essa enzima. Portanto, a diminuição da atividade de HDACs pode contribuir para a recuperação de déficits cognitivos.

Com os resultados encontrados neste estudo, é possível correlacionar a atividade da enzima HDAC e DNMT durante a fisiopatologia da sepse, pois essas duas enzimas epigenéticas apresentaram uma correlação positiva nos tempos de 24 horas, 10 dias e 30 dias pós sepse. As interações entre a metilação do DNA e a modificação da cromatina são conhecidas e descritas há muitos anos (Elliott et al., 2010; Binnie et al., 2020a). Há estudos que já comprovam que o DNA metilado poderia recrutar enzimas HDACs via MeCP2 (proteína 2 de ligação ao metil-CpG), levando à desacetilação de histonas e condensação da cromatina, conseqüentemente desfavorecendo a iniciação transcricional (Brink et al., 2013). Um outro estudo mostrou que a utilização de tricostatina A, um inibidor de HDAC, atenuou a repressão do DNA induzida pela sua própria metilação, apontando para um efeito cruzado entre essas duas alterações epigenéticas (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998; Yang et al., 2012).

Há indícios crescentes de que as modificações do epigenoma afetam o fenótipo das células imunes de forma a prejudicar as respostas à infecção e estão envolvidas na propagação de distúrbios inflamatórios (Sharma, Kelly e Jones, 2010). Enquanto a maioria das marcas epigenéticas são geralmente estáveis ao longo do tempo, aquelas em certos loci mostram alta plasticidade em resposta a fatores como o estresse e mudanças no ambiente, tornando-as de interesse no contexto de várias patologias (Vachharajani, Liu e McCall, 2014). Devido a isso, os mecanismos epigenéticos são de suma importância na fisiopatologia da sepse, apoiando a ideia de que intervenções terapêuticas como diferentes condições ambientais, podem ser um fator importante para modular as enzimas epigenéticas e um grande potencial de estudo para compreender em que momento estas alterações ocorrem e como se comportam durante a progressão da doença (Ji et al., 2017; Binnie et al., 2020b).

Evidenciou-se neste estudo que a exposição de ratos *Wistar* sépticos a um ambiente enriquecido, levou a regulação da atividade das enzimas HDAC e DNMT no tecido cerebral de hipocampo. De acordo com Lambert, Fernandez e Frick (2005) o EA pode produzir mudanças no hipocampo relacionadas ao aprendizado e a memória. Entende-se que o protocolo de EA está associado a mudanças neuroquímicas e fisiológicas no cérebro, se relacionando ao aumento de sinapses, tamanho neuronal, neurogênese, expressão de neurotropina, liberação de neurotransmissores e também no aumento das ramificações dendríticas, incluindo no cortical piramidal II / III e V (Diamond, 2001; Marashi et al., 2003).

Estudos atuais demonstram que as enzimas epigenéticas HDACs se mostram elevadas no cérebro de animais sépticos, evidenciando sua relação na neurodegeneração e nas funções cognitivas geradas pela sepse (Vachharajani, Liu e McCall, 2014; Hassan et al., 2018). Devido a isso, entende-se que a modulação epigenética está envolvida no cérebro séptico e a inibição de HDACs pode servir como uma abordagem terapêutica potencial para o tratamento da encefalopatia associada à sepse (Jiang et al., 2008; Fang et al., 2014).

A área da epigenética tornou-se um campo de estudo em expansão na imunologia, à medida que estudos crescentes indicam que os mecanismos epigenéticos podem conduzir as respostas imunológicas produtivas, a imunossupressão e autoimunidade deletérias (Hotchkiss, Monneret e Payen, 2013). Um crescente corpo de evidências experimentais sugere que os mecanismos epigenéticos, impulsionados por sinais ainda desconhecidos gerados durante a fase aguda da sepse, desempenham um papel importante na mediação da imunossupressão pós-sepse (Weiterer et al., 2015). As células Tregs da linhagem CD4 + são células capazes de suprimir as respostas imunes em uma variedade de contexto e podem ser consideradas o mecanismo central de regulação imunológica, pois possuem a função de controlar o sistema imune para que as respostas não sejam exacerbadas (Tatura et al., 2015; Fattahi e Ward, 2017; Nascimento et al., 2017). As Tregs funcionais requerem a expressão do fator de transcrição p3 (Foxp3) para a manutenção de sua atividade supressora, sendo que essa expressão em células T CD4 + requer modificações epigenéticas permissivas coordenadas, incluindo metilação e acetilação de histonas, bem como desmetilação de DNA nas regiões

promotoras e potencialmente específicas no locus *Foxp3* (Fontenot et al., 2005; Lal et al., 2009; Yadav e Cartin-Ceba, 2016). Com isso, entende-se que o aumento de células Tregs pode desempenhar um papel na mediação da imunossupressão, levando à inibição da responsividade imunológica durante a sepse (Venet e Monneret, 2017; Cao, Yu e Chai, 2019; Ren et al., 2020).

Conforme verificado em diversas análises e corroborando com os resultados apresentados nesse estudo, a indução de sepse em animais gera déficits de memória, aprendizagem e muitas vezes exibe sintomas do tipo depressivo (Tuon et al., 2008; Michels et al., 2015). Sabe-se que quando há exposição a um ambiente caracterizado como padrão, ou seja, que não apresenta estímulos físicos e sensoriais, esses fatores não apresentam melhora. Os dados do presente estudo mostram que os animais sépticos submetidos a um ambiente padrão apresentaram comprometimento cognitivo e exibiram um déficit de memória de longa duração quando comparados entre o seu treino e o teste. Sabe-se que as consequências neurocognitivas geradas pela fisiopatologia da sepse podem perpetuar em um ambiente padrão, mas quando há exposição a um ambiente enriquecido, estudos mostram que essas consequências geradas pela doença apresentam melhoras (Jackson et al., 2014; de Macedo et al., 2015; Ji et al., 2017). Esses achados vêm de encontro com os resultados evidenciados neste estudo, pois os animais sépticos submetidos ao protocolo de EA obtiveram a capacidade de reverter as alterações geradas pela sepse, pois apresentaram uma memória de longa duração. Notavelmente, o papel das condições ambientais sobre a função cognitiva é reversível, apresentando uma melhora no desempenho cognitivo quando submetidos a um protocolo de EA, que se caracteriza por levar a um aumento da aprendizagem espacial e prevenir dos déficits cognitivos gerados pela sepse (Winocur, 1998; Caruso et al., 2014; Wintermann et al., 2015).

Evidências mostram que a metilação do DNA é modulada dinamicamente por eventos dependentes de atividade neuronal (Kangaspeska et al., 2008; Métivier et al., 2008; Guo et al., 2011). Na última década, vários estudos foram realizados para entender o papel da metilação do DNA na função neuronal, sendo que muitos estudos sugerem que as enzimas DNMTs não desempenham apenas papéis críticos, incluindo impressão de genes e regulação da transcrição nos primeiros estágios de

desenvolvimento do SNC, mas também são indispensáveis na aprendizagem, memória e cognição, sendo que há relatos recentes que mostram a participação das enzimas DNMTs na consolidação da memória de longa duração (Miller e Sweatt, 2007; Morris e Monteggia, 2014; Singh, Srivas e Thakur, 2017).

Sabe-se que a IL-1 β é considerada um marcador inicial da sepse, pois expressa efeitos pró-inflamatórios que contribuem para uma intensa resposta celular ao patógeno, além de ter a capacidade de liberar mediadores secundários (Imamura et al., 2011; Olivieri et al., 2018). No presente estudo, os níveis de IL-1 β permaneceram elevados no hipocampo, quarenta e cinco dias após a sepse. Porém, os animais submetidos ao protocolo de EA apresentaram níveis significativamente diminuídos na estrutura cerebral. Entende-se então que a inflamação do cérebro persiste de forma tardia em animais sépticos, mas que o EA tem a capacidade de reverter esses danos gerados pela fisiopatologia da sepse.

Com relação a plasticidade sináptica, entende-se que é um termo caracterizado pelas respostas adaptativas geradas pelo SNC, referente aos estímulos produzidos. Grande parte dos sistemas que integram o cérebro são considerados plásticos, pois possuem a capacidade de serem alterados, confirmando que as sinapses podem ser modificadas por exemplo por estímulos ambientais, que de algum modo são captados por percepções sensoriais (Nithianantharajah, Levis e Murphy, 2004; Ohline e Abraham, 2019). Dessa forma, as sinapses são vulneráveis em condições neurodegenerativas, corroborando no entendimento de que a sepse é capaz de danificar proteínas sinápticas e conseqüentemente contribuir para o déficit cognitivo (Zong et al., 2019).

A PSD-95 é uma proteína estrutural de sinapse altamente estável que se liga a receptores NMDA e os estabiliza em neurônios pós-sinápticos, participa da maturação de botões sinápticos e favorece a sinapse excitatória (Berry e Nedivi, 2017; Xie et al., 2019). Outra proteína dependente de sinalização é a sinaptofisina, caracterizada por ser uma proteína de membrana presente nas vesículas sinápticas, que pode ser utilizada como um marcador específico dessas vesículas que estão presentes nos terminais sinápticos dos neurônios pré-sinápticos, e que desempenha um papel importante na liberação de neurotransmissores (Wang et al., 2017; Wood et al., 2019).

Pesquisas têm revelado que uma expressão anormal de PSD-95 ocorre em animais que apresentam uma lesão cerebral, mostrando que há relação com uma condução de sinais danificados. Em modelo animal de demência senil, os níveis de PSD-95 no cérebro se mostram reduzidos, corroborando para um declínio na capacidade de aprendizado e memória (Xiong et al., 2019). O presente estudo revelou que a sepse teve a capacidade de diminuir os níveis de PSD-95 no cérebro, especificamente no tecido de hipocampo. Porém, esses níveis aumentaram em animais sépticos submetidos ao protocolo de EA. Já a proteína pré-sináptica sinaptofisina não mostrou diferenças significativas no grupo CLP. Um estudo de Moraes et al. (2015) expôs que a sinaptofisina não apresentou alterações em seus níveis, porém a proteína PSD-95 demonstrou níveis significativamente reduzidos no hipocampo de camundongos 24 horas e 3 dias após a indução da sepse, contudo 30 dias após sepse a co-localização da PSD-95 foi estabelecida aos níveis normais.

O fato de ocorrer diferenças significativas nos níveis de PSD-95 e não na sinaptofisina pode ser explicado pelos diferentes modelos animais utilizados para os estudos e principalmente pelo tempo de determinação dessas proteínas (Xiong et al., 2019). Com isso, sugere-se que a redução no número de sinapses em animais sépticos pode ser devido a regulação da localização e/ou distribuição das proteínas sinápticas, ao invés da modulação de suas quantidades.

Desse modo, compreende-se que há uma correlação da perda de sinapses com o prejuízo cognitivo gerado na sepse, e que intervenções como o protocolo de EA podem ser benéficos na plasticidade sináptica dessa patologia.

Embora tenha sido elucidado a presença de alterações epigenéticas em modelo animal de sepse e que o protocolo de EA leva a uma melhora dessas variações e conseqüentemente uma diminuição dos danos cognitivos gerados pela doença, algumas limitações devem ser apontadas neste estudo. Primeiramente a inflamação foi avaliada somente a nível cerebral, exclusivamente no hipocampo, limitando o entendimento de como os eventos inflamatórios se comportam em outros órgãos durante a progressão da sepse. Já a plasticidade sináptica foi avaliada sem análise direta da estrutura do hipocampo, impossibilitando compreender como ocorre a condução de sinais normais e danificados. Com isso, entende-se que são necessários mais estudos a nível periférico, para poder investigar e entender por qual

mecanismo e qual célula é mais afetada pelo EA e para melhor esclarecimento dos mecanismos epigenéticos relacionados a fisiopatologia da sepse.

6 CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo sugerem que o estresse fisiológico que é gerado e transmitido ao sistema imunológico durante o quadro de sepse grave, pode apresentar efeitos significativos na expressão gênica no cérebro, especificamente no tecido de hipocampo, tanto a curto quanto a longo prazo. Devido a isso, o ambiente enriquecido pode ter a capacidade de retardar e melhorar os déficits cognitivos induzidos pela doença, e ser uma estratégia com grande potencial de modulação das enzimas epigenéticas em modelo animal de sepse.

7 REFERÊNCIAS

Abraham E. New Definitions for Sepsis and Septic Shock: Continuing Evolution but With Much Still to Be Done. *JAMA*. 2016; 315: 757-759.

Alamdari N, Smith IJ, Aversa Z, Hasselgren PO. Sepsis and glucocorticoids upregulate p300 and downregulate HDAC6 expression and activity in skeletal muscle. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2010; 299: 509-520.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*. 2001; 29: 1303-1310.

Angus DC, Van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *New England Journal of Medicine*. 2013; 369: 840-851.

Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annual Review of Immunology*. 2006; 24: 607-656.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Critical Care Medicine*. 2005; 33: 221-3.

Berry KP, Nedivi E. Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron*. 2017; 96: 43-55.

Binnie A, Tsang JLY, Hu P, Carrasqueiro G, Castelo-Branco P, Dos Santos CC. Epigenetics of Sepsis. *Critical Care Medicine*. 2020; 48: 745-756a.

Binnie A, Walsh CJ, Hu P, Dwivedi DJ, Fox-Robichaud A, Liaw PC, Tsang JLY, Batt J, Carrasqueiro G, Gupta S, Marshall JC, Castelo-Branco P, Dos Santos CC. Epigenetic Profiling in Severe Sepsis: A Pilot Study of DNA Methylation Profiles in Critical Illness. *Critical Care Medicine*. 2020; 48: 142-150b.

Birch AM, Kelly ÁM. Lifelong environmental enrichment in the absence of exercise protects the brain from age-related cognitive decline. *Neuropharmacology*. 2019; 145: 59-74.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*. 2002; 16: 6-21.

Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Annals of Internal Medicine*. 1991; 115: 457-469.

Bracht H, Hafner S, Weib M. Sepsis Update: Definition and Epidemiology. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2019; 54: 10-20.

Brink MC, Piebes DG, de Groot ML, Luijsterburg MS, Casas-Delucchi CS, van Driel R, Rots MG, Cardoso MC, Verschure PJ. A role for MeCP2 in switching gene activity via chromatin unfolding and HP1 γ displacement. *PLoS One*. 2013; 8: 69347.

Brod S, Gobetti T, Gittens B, Ono B, Masahiro O, Perretti M, D'Acquisto F. The Impact of Environmental Enrichment on the Murine Inflammatory Immune Response. *JCI Insight*. 2017; 2: 907-923.

Brooks HF, Osabutey CK, Moss RF, Andrews PLR, Davies DC. Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. *Metabolic brain disease*. 2007; 22: 353-373.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Model organisms: animal models of sepsis: setting the stage. *Nature reviews Drug discovery*. 2005; 4: 854-865.

Cao C, Yu M, Chai Y. Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis. *Cell Death & Disease*. 2019;10: 782.

Carson WF, Cavassani KA, Dou Y, Kunkel SL. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics*. 2011; 6: 273-283.

Caruso P, Guardian L, Tiengo T, Dos Santos LS, Junior PM. ICU architectural design affects the delirium prevalence: a comparison between single-bed and multibed rooms. *Critical Care Medicine*. 2014; 42: 2204-2210.

Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and Septic Shock. *Lancet*. 2018; 392: 75-87.

Ciarlo E, Heinonen T, Herderschee J, Fenwick C, Mombelli M, Le Roy D, Roger T. Impact of the microbial derived short chain fatty acid propionate on host susceptibility to bacterial and fungal infections in vivo. *Scientific Reports*. 2016; 6: 37944.

Ciarlo E, Savva A, Roger T. Epigenetics in Sepsis: Targeting Histone Deacetylases. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2013; 42: 8-12.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002; 420: 885-891.

Cole J, Morris P, Dickman MJ, Dockrell DH. The therapeutic potential of epigenetic manipulation during infectious diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. 2016; 167: 85-99.

Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Rezin GT, Scaini G, Daufembach JF, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochemical Research*. 2011; 36: 304-11.

Comim CM, Rezin GT, Scaini G, Di-Pietro PB, Cardoso MR, Petronilho FC, Ritter C, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Mitochondrial respiratory chain and creatine

kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Mitochondrion*. 2008; 8: 313-8.

Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LC, Petronilho F, Constantino LS, Stertz L, Kapczinski F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Depressive-like parameters in sepsis survivor rats. *Neurotoxicity Research*. 2010; 17: 279-86.

Cross D, Drury R, Hill J, Pollard AJ. Epigenetics in Sepsis: Understanding Its Role in Endothelial Dysfunction, Immunosuppression, and Potential Therapeutics. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 13-63.

Czerniawski J, Guzowski JF. Acute neuroinflammation impairs context discrimination memory and disrupts pattern separation processes in hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 2014; 34: 12470-12480.

Dal-Pizzol F, Tomasi SD, Ritter C. Septic encephalopathy: does inflammation drive the brain crazy. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2014; 36: 251-258.

Davis FM, Schaller MA, Dendekker A, Joshi AD, Kimball AS, Evanoff H, Wilke C, Obi AT, Melvin WJ, Cavassani K, Scola M, Carson B, Moser S, Blanc V, Engoren M, Moore BB, Kunkel SL, Gallagher KA. Sepsis Induces Prolonged Epigenetic Modifications in Bone Marrow and Peripheral Macrophages Impairing Inflammation and Wound Healing. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2019; 39: 2353-2366.

De Lima MNM, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schröder N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behavioural Brain Research*. 2005;156: 139-143.

de Macedo LD, De Oliveira TC, Soares FC, Bento-Torres J, Bento-Torres NVO, Anthony DC, Picanço-Diniz CW. Beneficial effects of multisensory and cognitive stimulation in institutionalized elderly: 12-months follow-up. *Clinical Interventions in Aging*. 2015; 10: 1351-1359.

Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity*. 2014; 40: 463-475.

Diamond MC. Response of the brain to enrichment. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2001; 73: 211-220.

Dozmorov MG, Giles CB, Koelsch KA, Wren JD. Systematic classification of non-coding RNAs by epigenomic similarity. *BMC bioinformatics*. 2013; 14: 52-63.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004; 429: 457-463.

El Gazzar M, Yoza BK, Chen X, Hu J, Hawkins GA, McCall CE. G9a and HP1 couple histone and DNA methylation to TNF α transcription silencing during endotoxin tolerance. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283: 32198-32208.

Elliott E, Ezra-Nevo G, Regev L, Neufeld-Cohen A, Chen A. Resilience to social stress coincides with functional DNA methylation of the Crf gene in adult mice. *Nature Neuroscience*. 2010; 13: 1351-1353.

Eskandarian HA, Impens F, Nahori MA, Soubigou G, Coppée JY, Cossart P, Hamon MA. A role for SIRT2-dependent histone H3K18 deacetylation in bacterial infection. *Science*. 2013; 341: 1238858.

Eslaminejad MB, Fani N, Shahhoseini M. Epigenetic regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in culture. *Cell Journal*. 2013; 15: 1-10.

Fang J, Lian Y, Xie K, Cai S, Wen P. Epigenetic modulation of neuronal apoptosis and cognitive functions in sepsis-associated encephalopathy. *Neurological Sciences*. 2014; 35: 283-288.

Fattahi F, Ward PA. Understanding Immunosuppression after Sepsis. *Immunity*. 2017; 47: 3-5.

Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2016; 193: 259-272.

Flohé SB, Agrawal H, Schmitz D, Gertz M, Flohé S, Schade FU. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006; 79: 473-481.

Font MD, Thyagarajan B, Khanna AK. Sepsis and Septic Shock - Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. *Medical Clinics of North America*. 2020;104: 573-585.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. 2005; 22: 329-341.

Fuchs F, Cosquer B, Penazzi L, Mathis C, Kelche C, Majchrzak M, Barbelivien A. Exposure to an enriched environment up to middle age allows preservation of spatial memory capabilities in old age. *Behavioural Brain Research*. 2016; 299: 1-5.

Griton M, Dhaya I, Nicolas R, Raffard G, Periot O, Hiba B, Konsman JP. Experimental sepsis-associated encephalopathy is accompanied by altered cerebral blood perfusion and water diffusion and related to changes in cyclooxygenase-2 expression and glial cell morphology but not to blood-brain barrier breakdown. *Brain Behavior and Immunity*. 2020; 83: 200-213.

Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJF, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, De Pinho RA, Jaenisch R, Tsai LH.

HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*. 2009; 459: 55-60.

Guo JU, Ma DK, Mo H, Ball MP, Jang M, Bonaguidi MA, Balazer JA, Eaves HL, Xie B, Ford E, Zhang K, Ming G, Gao Y, Song H. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nature Neuroscience*. 2011; 14: 1345-1351.

Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief*. 2011; 62: 1-8.

Hassan FI, Didari T, Khan F, Mojtahedzadeh M, Abdollahi M. The Role of Epigenetic Alterations Involved in Sepsis: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*. 2018; 24: 2862-2869.

Hewagama A, Richardson B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*. 2009; 33: 3-11.

Holliday R. Epigenetics: A Historical Overview. *Epigenetics*. 2006; 1: 76-80.

Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 1987; 238: 163-170.

Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2013; 13: 862-874.

Hubacek JA, Stüber F, Fröhlich D, Book M, Wetegrove S, Ritter M, Rothe G, Schmitz G. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Critical Care Medicine*. 2001; 29: 557-561.

Hunt A. Sepsis: an overview of the signs, symptoms, diagnosis, treatment and pathophysiology. *Emergency Nurse*. 2019; 27: 32-41.

Imamura Y, Wang H, Matsumoto N, Muroya T, Shimazaki J, Ogura H, Shimazu T. Interleukin-1 β causes long-term potentiation deficiency in a mouse model of septic encephalopathy. *Neuroscience*. 2011; 187: 63-69.

Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term Cognitive Impairment and Functional Disability Among Survivors of Severe Sepsis. *JAMA*. 2010; 304: 1787-1794.

Jackson JC, Pandharipande PP, Girard TD, Brummel NE, Thompson JL, Hughes CG, Pun BT, Vasilevskis EE, Morandi A, Shintani AK, Hopkins RO, Bernard GR, Dittus RS, Ely EW. Depression, post-traumatic stress disorder, and functional disability in survivors of critical illness in the BRAIN-ICU study: a longitudinal cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2014; 2: 369-379.

Ji M, Tang H, Luo D, Qiu L, Jia M, Yuan H, Feng S, Yang J. Environmental conditions differentially affect neurobehavioral outcomes in a mouse model of sepsis-associated encephalopathy. *Oncotarget*. 2017; 8: 82376-82389.

Jiang Y, Langley B, Lubin FD, Renthal W, Wood MA, Yasui DH, Kumar A, Nestler EJ, Akbarian S, Beckel-Mitchener AC. Epigenetics in the nervous system. *Journal of Neuroscience*. 2008; 28: 11753-11759.

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*. 1998; 19: 187-191.

Kaneko K, Chikamoto A, Hsu JC, Tochinai R, Sekizawa S, Yamamoto M, Kuwahara M. Effects of environmental enrichment on autonomic nervous activity in NSY mice. *Experimental Animals*. 2020; 69: 161-167.

Kangaspeska S, Stride B, Métivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, Benes V, Gannon F, Reid G. Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature*. 2008; 452: 112-115.

Kauss IAM, Grion CMC, Cardoso LTQ, Anami EHT, Nunes L B, Ferreira GL, Matsuo T, Bonametti AM. The epidemiology of sepsis in a Brazilian teaching hospital. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010; 14: 264-270.

Kempermann G. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nature Reviews Neuroscience*. 2019; 20: 235-245.

Lal G, Zhang N, van der Touw W, Ding Y, Ju W, Bottinger EP, Reid SP, Levy DE, Bromberg JS. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol*. 2009; 182: 259-273.

Lambert TJ, Fernandez SM, Frick KM. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2005; 83: 206-216.

Leger M, Paizanis E, Dzahini K, Quiedeville A, Bouet V, Cassel JC, Frenet T, Schumann-Bard P, Boulouard M. Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. *Cerebral Cortex*. 2015; 25: 4048-4061.

Lehmann ML, Herkenham M. Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *The Journal of Neuroscience*. 2011; 31: 6159-6173.

Liang Y, Li X, Zhang X, Li Z, Wang L, Sun Y, Liu Z, Ma X. Elevated levels of plasma TNF- α are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Shock*. 2014; 41: 275-281.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193: 265-267.

Machado FR, Cavalcanti AB, Bozza FA, Ferreira EM, Carrara FSA, Sousa JL, Caixeta N, Salomao R, Angus DC, Azevedo LCP. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017; 17: 1180-1189.

Mackenzie I, Lever A. Management of sepsis. *British Medical Journal*. 2007; 335: 929-932.

Marashi V, Barnekow A, Ossendorf E, Sachser N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Hormones and Behavior*. 2003; 43: 281-292.

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine*. 2003; 348: 1546-1554.

Mazeraud A, Righy C, Bouchereau E, Benghanem S, Bozza FA, Sharshar T. Septic-Associated Encephalopathy: a Comprehensive Review. *Neurotherapeutics*. 2020; 17: 392-403.

Mehler MF. Epigenetics and the nervous system. *Annals of Neurology*. 2008; 64: 602-617.

Messarlis E, Memos N, Chatzigianni E, Konstadoulakis MM, Menenakos E, Katsaragakis S, Voumvourakis C, Androulakis G. Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death. *Critical Care Medicine*. 2004; 8: 1764-1770.

Métivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Péron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G, Benes V, Jeltsch A, Gannon F, Salbert G. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature*. 2008; 452: 45-50.

Michels M, Abatti MR, Ávila P, Vieira A, Borges H, Junior CC, Wendhausen D, Gasparotto J, Ribeiro CT, Moreira JCF, Gelain DP, Dal-Pizzol F. Characterization and Modulation of Microglial Phenotypes in an Animal Model of Severe Sepsis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020; 24: 88-97.

Michels M, Danielski LG, Dal-Pizzol F, Petronilho F. Neuroinflammation: microglial activation during sepsis. *Current Neurovascular Research*. 2014; 11: 262-270.

Michels M, Vieira AS, Vuolo F, Zapelini HG, Mendonça B, Mina F, Dominghini D, Steckert A, Schuck PF, Quevedo J, Petronilho F, Dal-Pizzol F. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2015; 43: 54-59.

Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*. 2007; 53: 857-869.

Mina F, Comim CM, Domingui D, Cassol Jr OJ, Dall Igna DM, Ferreira GK, Silva MC, Galant LS, Streck EL, Quevedo J, Dal Pizzol F. IL-1 β involvement in cognitive impairment after sepsis. *Molecular Neurobiology*. 2014; 49: 1069-1076.

Miquelin PRS, Reis GR. Comparação entre as taxas de morbimortalidade de pacientes com septicemia em todos os estados da federação e o Distrito Federal. *Revista Amazônia Science & Health*. 2016; 4: 20-24.

Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *Journal of cellular physiology*. 2007; 213: 384-390.

Moraes CA, Santos G, de Sampaio e Spohr TC, D'Avila JC, Lima FRS, Benjamim CF, Bozza FA, Gomes FCA. Activated Microglia-Induced Deficits in Excitatory Synapses Through IL-1 β : Implications for Cognitive Impairment in Sepsis. *Molecular Neurobiology*. 2015; 52: 653-663.

Moreno R, Afonso S, Fevereiro T. Incidence of sepsis in hospitalized patients. *Current Infectious Disease Reports*. 2006; 8: 346-350.

Morris MJ, Monteggia LM. Role of DNA methylation and the DNA methyltransferases in learning and memory. *Dialogues Clinical Neuroscience*. 2014; 16: 359-371.

Nabzdyk CS, Couture EJ, Shelton K, Cudemus G, Bittner EA. Sepsis induced cardiomyopathy: Pathophysiology and use of mechanical circulatory support for refractory shock. *Journal of Critical Care*. 2019; 54: 228-234.

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998; 393: 386-389.

Napolitano LM. Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. *Surgical Infections (Larchmt)*. 2018; 19: 117-125.

Nascimento DC, Melo PH, Piñeros AR, Ferreira RG, Colón DF, Donate PB, Castanheira FV, Gozzi A, Czaikoski PG, Niedbala W, Borges MC, Zamboni DS, Liew FY, Cunha FQ, Alves-Filho JC. IL-33 Contributes to Sepsis-Induced Long-Term Immunosuppression by Expanding the Regulatory T Cell Population. *Nature Communications*. 2017; 8: 14919.

Nithianantharajah J, Levis H, Murphy M. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2004; 81: 200-210.

Ohline SM, Abraham WC. Environmental enrichment effects on synaptic and cellular physiology of hippocampal neurons. *Neuropharmacology*. 2019; 145: 3-12.

Olivieri R, Michels M, Pescador B, Ávila P, Abatti M, Cucker L, Burger H, Domingui D, Quevedo J, Dal-Pizzol F. The additive effect of aging on sepsis-induced cognitive impairment and neuroinflammation. *Journal of Neuroimmunology*. 2018; 314: 1-7.

Oviedo-Boyso J, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre, Víctor M. Collaborative action of Toll-like and NOD-like receptors as modulators of the inflammatory response to pathogenic bacteria. *Mediators of inflammation*. 2014; 2014: 1-16.

Parrilo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *New England Journal of Medicine*. 1993; 328: 1471-1477.

Prescott HC, Angus DC. Enhancing Recovery from Sepsis: A Review. *JAMA*. 2018; 319: 62-75.

Quintano Neira RA, Hamacher S, Japiassú AM. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. *PLoS One*. 2018;13: 1-15.

Rangel-Frausto MS. Sepsis: still going strong. *Archives of Medical Research*. 2005; 36: 672-681.

Ren C, Yao RQ, Zhang H, Feng YW, Yao YM. Sepsis-associated encephalopathy: a vicious cycle of immunosuppression. *Journal of Neuroinflammation*. 2020; 17: 14.

Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007; 81: 137-143.

Robba C, Crippa IA, Taccone FS. Septic Encephalopathy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2018; 18: 82.

Salomão R, Ferreira BL, Salomão MC, Santos SS, Azevedo LCP, Brunialti MKC. Sepsis: evolving concepts and challenges. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2019; 52: e8595.

Schwalm MT, Pasquali M, Miguel SP, Dos Santos JP, Vuolo F, Comim CM, Petronilho F, Quevedo J, Gelain DP, Moreira JC, Ritter C, Dal-Pizzol F. Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. *Molecular Neurobiology*. 2014; 49: 380-385.

Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld A, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, Deutschman CS, Escobar GJ, Angus DC. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315: 762-774.

Shah FA, Pike F, Alvarez K, Angus D, Newman AB, Lopez O, Tate J, Kapur V, Wilsdon A, Krishnan JA, Hansel N, Au D, Avdalovic M, Fan VS, Barr RG, Yende S. Bidirectional relationship between cognitive function and pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2013; 188: 586-592.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31:27-36.

Silva CT, Jasiulionis MG. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. *Ciência e Cultura*. 2014; 66: 38-42.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche DJ, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, Van der Poll T, Vicent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315: 801-810.

Singh P, Srivas S, Thakur MK. Epigenetic Regulation of Memory-Therapeutic Potential for Disorders. *Current Neuropharmacology*. 2017; 15: 1208-1221.

Stankiewicz AM, Swiergiel AH, Lisowski P. Epigenetics of stress adaptations in the brain. *Brain Research Bulletin*. 2013; 98: 76-92.

Steckert AV, Comim CM, Mina F, Mendonça BP, Domingui D, Ferreira GK, Carvalho-Silva M, Vieira JS, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Late brain alterations in sepsis-survivors. *Synapse*. 2013; 11: 786-793.

Taeb AM, Hooper MH, Marik PE. Sepsis: Current Definition, Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Nutrition in Clinical Practice*. 2017; 32: 296-308.

Takai D, Abe A, Miura H, Tanaka S, Komura JI. Minimum environmental enrichment is effective in activating antitumor immunity to transplanted tumor cells in mice. *Experimental Animals*. 2019; 68: 569-576.

Tatura R, Zeschnigk M, Hansen W, Steinmann J, Vidigal PG, Hutzler M, Pastille E, Westendorf AM, Buer J, Kehrmann J. Relevance of Foxp3⁺ regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. *Immunology*. 2015; 146: 144-156.

Tian Y, Meng L, Zhang Y. Epigenetic Regulation of Dendritic Cell Development and Function. *Cancer Journal*. 2017; 23: 302-307.

Torio CM, Andrews RM. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011. *Healthcare Cost and Utilization Project*. 2013; 31: 208-219.

Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007; 8: 355-367.

Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Medicine*. 2008; 34: 1724-1731.

Unternaehrer E, Luers P, Mill J, Dempster E, Meyer AH, Staehli S, Lieb R, Hellhammer DH, Meinschmidt G. Dynamic changes in DNA methylation of stress-associated genes (OXTR, BDNF) after acute psychosocial stress. *Translational Psychiatry*. 2012; 2: e150.

Vachharajani V, Liu T, McCall CE. Epigenetic coordination of acute systemic inflammation: potential therapeutic targets. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2014; 10: 1141-1150.

Vachharajani V, McCall CE. Epigenetic and metabolic programming of innate immunity in sepsis. *Innate Immunity*. 2019; 25: 267-279.

Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nature Reviews Nephrology*. 2017; 14: 121-137.

Venet F, Rimmelé T, Monneret G. Management of Sepsis-Induced Immunosuppression. *Critical Care Clinics*. 2018; 34: 97-106.

Verdonk F, Blet A, Mebazza A. The New Sepsis Definition: Limitations and Contribution to Research and Diagnosis of Sepsis. *Current Opinion in Anesthesiology*. 2017; 30: 200-204.

Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, De Paris F, Furman M, De Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learning & Memory*. 2000; 7: 333-340.

Vincent JL, Korkut HA. Defining Sepsis. *Clinics In Chest Medicine*. 2008; 29: 585-590.

Volkers KM, Scherder EJ. Impoverished environment, cognition, aging and dementia. *Nature Reviews Neuroscience*. 2011; 22: 259-266.

Waddington CH. The Epigenotype. *International Journal of Epidemiology*. 2011; 41: 10-13.

Wakeley ME, Gray CC, Monaghan SF, Heffernan DS, Ayala A. Check Point Inhibitors and Their Role in Immunosuppression in Sepsis. *Critical Care Clinics*. 2020; 36: 69-88.

Wang B, Jin X, Kuang X. Chronic administration of parecoxib exerts anxiolytic-like and memory enhancing effects and modulates synaptophysin expression in mice. *BMC Anesthesiology*. 2017; 17: 152.

Warford J, Lamport AC, Kennedy B, Easton AS. Human Brain Chemokine and Cytokine Expression in Sepsis: A Report of Three Cases. *Canadian Journal of Neurological Sciences*. 2017; 44: 96-104.

Weiterer S, Uhle F, Siegler BH, Lichtenstern C, Bartkuhn M, Weigand MA. Epigenetische Regulation in der Sepsis: Aktueller Wissensstand [Epigenetic regulation in sepsis: current state of knowledge]. *Anaesthesist*. 2015; 64: 42-55.

Wen H, Schaller MA, Dou Y, Hogaboam CM, Kunkel SL. Dendritic cells at the interface of innate and acquired immunity: the role for epigenetic changes. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008; 83: 439-446.

Winocur G. Environmental influences on cognitive decline in aged rats. *Aging Neurobiology of Aging*. 1998; 19: 589-597.

Wintermann GB, Brunkhorst FM, Petrowski K, Strauss B, Oehmichen F, Pohl M, Rosendahl J. Stress disorders following prolonged critical illness in survivors of severe sepsis. *Critical Care Medicine*. 2015; 43: 1213-1222.

Wood M, Adil O, Wallace T, Fourman S, Wilson SP, Herman JP, Myers B. Infralimbic prefrontal cortex structural and functional connectivity with the limbic forebrain: a combined viral genetic and optogenetic analysis. *Brain Structure and Function*. 2019; 224: 73-97.

Wu DD, Li T, Ji XY. Dendritic Cells in Sepsis: Pathological Alterations and Therapeutic Implications. *Journal of Immunology Research*. 2017; 2017: 3591248.

Wu J, Dong L, Zhang M, Jia M, Zhang G, Qiu L, Ji M, Yang J. Class I histone deacetylase inhibitor valproic acid reverses cognitive deficits in a mouse model of septic encephalopathy. *Neurochemical Research*. 2013; 38: 2440-2449.

Xie MJ, Ishikawa Y, Yagi H, Iguchi T, Oka Y, Kuroda K, Iwata K, Kiyonari H, Matsuda S, Matsuzaki H, Yuzaki M, Fukazawa Y, Sato M. PIP3-Phldb2 is crucial for LTP regulating synaptic NMDA and AMPA receptor density and PSD95 turnover. *Scientific Reports*. 2019; 9: 4305.

Xiong CQ, Zhou HC, Wu J, Guo NZ. The Protective Effects and the Involved Mechanisms of Tanshinone IIA on Sepsis-Induced Brain Damage in Mice. *Inflammation*. 2019; 42: 354-364.

Yadav H, Cartin-Ceba R. Balance between Hyperinflammation and Immunosuppression in Sepsis. *Seminars In Respiratory And Critical Care Medicine*. 2016; 37: 42-50.

Yang T, Ramocki MB, Neul JL, Lu W, Roberts L, Knight J, Ward CS, Zoghbi HY, Kheradmand F, Corry DB. Overexpression of methyl-CpG binding protein 2 impairs T(H)1 responses. *Science Translational Medicine*. 2012; 4: 158-163.

Zhang QH, Sheng ZY, Yao YM. Septic encephalopathy: when cytokines interact with acetylcholine in the brain. *Military Medical Research*. 2014; 1: 20.

Ziaja M. Sepsis and septic encephalopathy: characteristics and experimental models. *Folia Neuropathology*. 2012; 50: 231-239.

Zong MM, Yuan HM, He X, Zhou ZQ, Qiu XD, Yang JJ, Ji MH. Disruption of Striatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase Signaling Might Contribute to Memory Impairment in a Mouse Model of Sepsis-Associated Encephalopathy. *Neurochemical Research*. 2019; 44: 2832-2842.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do primeiro comitê de ética no uso de animais.



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **09/04/2019**.

Título do projeto	Modulação epigenética através de enriquecimento ambiental em modelo animal de sepse
Project title	Epigenetic modulation through environmental enrichment in animal model of sepsis.
Número do protocolo Protocol number	006/2019-1
Pesquisador principal Principal Investigator	FELIPE DAL PIZZOL
Pesquisadores Researchers	Mariane Abatti, Andriele da Silva Vieira e Heloisa Borges.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/05/2019 a 30/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Idade/Peso	2 meses/200-300 g
Gênero	Masculinos
Número de animais	56
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Wilson Heizen Cardoso
Coordenador Adjunto do CEUA

Criciúma, 09 de abril de 2019.

ANEXO B – Aprovação do segundo comitê de ética no uso de animais.



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **30/07/2019**.

Título do projeto	Modulação epigenética através de ambiente enriquecido melhora o dano cognitivo em animais submetidos a sepse.
Project title	Epigenetic modulation through enriched environment improves cognitive damage in animals submitted to sepsis.
Número do protocolo Protocol number	88/2019-1
Pesquisador principal Principal Investigator	Felipe Dal-Pizzol
Pesquisadores Researchers	Mariane Abatti, Andriele da Silva Vieira, Emily da Silva Córneo, Heloisa Borges, Amanda Goulart Indalecio, Filipe Fernandes Gabriel, Cristiano Julio Faller, Anderson Miada Marcelo.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2019 a 01/05/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	2 meses / 200-300g
Número de animais / Gênero	70 / masculino
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.


Samira da Silva Valvassori
Coordenadora do CEUA

Criciúma, 30 de julho de 2019.