

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

MARIANE ROCHA ABATTI

**EFEITOS DA DEXMEDETOMIDINA SOBRE ALTERAÇÕES
COGNITIVAS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA SEPSE**

CRICIÚMA

2022

MARIANE ROCHA ABATTI

**EFEITOS DA DEXMEDETOMIDINA SOBRE ALTERAÇÕES
COGNITIVAS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA SEPSE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

CRICIÚMA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A119e Abatti, Mariane Rocha.

Efeitos da dexmedetomidina sobre alterações cognitivas e neuroquímicas induzidas pela sepse / Mariane Rocha Abatti. - 2022.

108 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2022.

Orientação: Felipe Dal Pizzol.

1. Dexmedetomidina - Efeitos colaterais. 2. Receptores adrenérgicos alfa 2. 3. Encefalopatia séptica. 4. Sepse. 5. Neuroproteção. I. Título.

CDD. 22. ed. 615.1

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

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.
Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho, pelas oportunidades que sempre tive neste meio acadêmico e por me fornecer caminhos para chegar aonde cheguei. Agradeço também à Ele por me proporcionar força e determinação para seguir em frente meio as inúmeras adversidades encontradas.

Agradeço à minha família, principalmente ao meu pai Laércio e minha mãe Márcia, que graças a Deus sempre me incentivaram a estudar e me proporcionaram meios para que eu pudesse trilhar a vida acadêmica e que muitas vezes tiveram paciência e compreensão para que eu estudasse em casa.

Ao meu orientador Felipe Dal Pizzol, por me aceitar no seu grupo de pesquisa, por proporcionar meios para realizar esta tese, por todo o seu conhecimento passado a nós alunos e por confiar em mim nesta missão de construir este projeto, bem como com o restante das tarefas realizadas no laboratório.

Ao meu namorado Leonardo, pelo apoio e torcida durante toda esta jornada acadêmica.

Aos integrantes do laboratório de fisiopatologia experimental, que participaram de toda minha trajetória no desenvolvimento deste trabalho, Andriele, Amanda, Monique, Emily, Luana, Helo e Diogo.

Em especial à minha grande amiga Andriele que ganhei no laboratório, que por muito tempo me fez companhia, ouviu minhas reclamações diárias, me incentivou, me deu forças e esteve sempre ao meu lado, mesmo depois de ter encerrado sua jornada no grupo de pesquisa. De longe o melhor presente do mestrado/doutorado.

Ao meu casal favorito Cris e Amanda pela amizade construída, pelo apoio e principalmente a Amanda por me acompanhar nos estudos sobre a DEX.

A Luana que no meu penúltimo semestre foi o meu braço direito, me auxiliou não somente em todas as etapas dos experimentos, mas também foi minha parceira e trouxe muita leveza para meus dias no laboratório. Obrigada por me entender e me acompanhar nesta jornada.

Agradeço também a todos os membros da banca: Gi, Tati, Daniel e Hugo. E as bancas da qualificação Gi Réus e Cinara, pela dedicação e por me instruírem na construção deste trabalho.

Epor fim sou imensamente grata a CAPES por fazer desta pesquisa possível e proporcionas subsídios para que ela saísse do papel.

RESUMO

A sepse é caracterizada pela produção excessiva de mediadores inflamatórios, que ao afetar o sistema nervoso central (SNC), gera danos cerebrais e comprometimento cognitivo ao longo prazo em pacientes sobreviventes. Algumas evidências em modelos animais de isquemia sugerem que a ativação de receptores alfa-2 adrenérgicos possa exercer papel protetor na lesão neuronal, clinicamente um agonista seletivo destes receptores (a dexmedetomidina) reduz disfunção cerebral em pacientes criticamente enfermos. Desta forma o objetivo deste estudo foi determinar se a ativação de receptores α_2 adrenérgicos, pela Dexmedetomidina (DEX), pode proteger animais dos déficits cognitivos induzidos pela sepse. Foi utilizado também um antagonista dos receptores α_2 adrenérgicos, idazoxano (IDA), para observar o possível bloqueio deste receptor com a DEX. Para tanto, ratos *Wistar* machos adultos foram submetidos a sepse (pelo método CLP) ou somente ao procedimento cirúrgico sem sepse (sham operados). Foi utilizado ratos *Wistar*, todos com a idade de 60 dias. Para a primeira parte dos experimentos os animais foram divididos em cinco grupos: 1) Sham; 2)CLP (); 3) CLP + DEX; 4) CLP + IDA; 5) CLP + IDA + DEX. Sendo que os tratamentos foram realizados por três dias consecutivos após sepse. Estes grupos foram avaliados ainda em três tempos, com eutanásia em 24 horas, 10 dias e 30 dias após tratamentos para contemplar todos os objetivos do estudo. Em 24 horas, 10 dias e 30 dias foi avaliado inflamação cerebral através dos níveis de citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10; Expressão do receptor α_2 adrenérgicos, ativação microglial através de imunohistoquímica de IBA-1 e expressão de proteínas relacionadas a apoptose (BAX e Bcl-2) e plasticidade sináptica (PSD-95) com a finalidade de gerar um melhor entendimento da relação da ativação de receptores α_2 adrenérgicos e alterações induzidas pela sepse. Nos animais que foram eutanasiados 10 e 30 dias após sepse, anteriormente foi acompanhado a mortalidade dos animais e foi avaliado alterações comportamentais através dos testes de habituação a campo aberto, esquiva inibitória e reconhecimento de novos objetos, para melhor compreender as alterações na memória. Para a segunda parte dos experimentos, os animais foram tratados a partir do 15º dia após sepse, durante três dias consecutivos e foram novamente divididos em cinco grupos, com eutanásia logo após o tratamento e comportamento e novamente 30 dias após sepse. Para estes animais foi avaliado alterações comportamentais, através dos mesmos testes citados

anteriormente, bem como os níveis de citocinas. Pode-se observar que tanto durante o desenvolvimento da sepse, quanto com o tratamento tardio, que a DEX foi protetora, causando diminuição de citocinas pró-inflamatórias, redução da ativação microglial, promovendo o balanço de proteínas pro e anti-apoptóticas, modulação de glutamato e principalmente preservando a memória de aprendizado. Já o IDA, utilizado para antagonizar os efeitos da DEX, demonstrou apresentar antagonismo apenas parcialmente, conseguindo bloquear efeitos da DEX apenas em algumas tarefas relacionadas a memória e em alguns parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Sepse. Encefalopatia séptica. Dexmedetomidina. Receptor α 2-Adrenérgico

ABSTRACT

Sepsis is characterized by the excessive production of inflammatory mediators, which when affecting the CNS, generates brain damage and long-term cognitive impairment in surviving patients. Some evidence in animal models of ischemia suggests that the activation of alpha-2 adrenergic receptors may play a protective role in neuronal injury and clinically a selective agonist of these receptors (Dexmedetomidine) reduces brain dysfunction in critically ill patients. Thus, the aim of this study was to determine whether the activation of α_2 adrenergic receptors, by Dexmedetomidine, could protect animals from cognitive deficits induced by sepsis. It was also used an α_2 adrenergic receptor antagonist, Idazoxan (IDA), to observe the possible blockage of this receptor to Dexmedetomidine. For that, adult male *Wistar* rats underwent sepsis (CLP model) or sham surgery. It was used *Wistar* rats all at the age of 60 days. The animals were divided into five groups: 1) Sham + Saline; 2) CLP; 3) CLP + DEX; 4) CLP + IDA; 5) CLP + IDA + DEX. Treatments were carried out for three consecutive days after sepsis. These groups were also evaluated in three stages, with euthanasia in 24 hours, 10 and 30 days to contemplate all the objectives of the study. In 24 hours, 10 and 30 days brain inflammation was assessed through the levels of cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-10; Expression of α_2 -a adrenergic receptor, microglial activation through immunohistochemistry of IBA-1 and expression of proteins related to apoptosis (BAX and Bcl-2) and synaptic plasticity (PSD-95) in order to generate a better understanding of the relationship between the activation of α_2 adrenergic receptors and alterations induced by sepsis. In animals that were euthanized 10 and 30 days after sepsis, animal mortality was previously monitored and behavioral changes were assessed through habituation tests in the open field, inhibitory avoidance and recognition of new objects, to better understand the changes in memory. For the second part of experiments, the animals were treated from the 15th day after sepsis, for three consecutive days, and were again divided into five groups, with euthanasia 19 and 30 days after sepsis. Behavioral changes were evaluated for these animals, through the same tests mentioned above, as well as the levels of cytokines. It was possible to observe that during the development of sepsis, as well as during the late treatment, that DEX was protective, causing reduction of proinflammatory cytokines, reduction of microglial activation, promoting the balance between pro and anti apoptotic proteins, modulation of glutamate and mainly preserving memory and learning. The IDA, used to antagonize the effects of DEX, showed only partial block, managing to block DEX only in some parameters.

Keywords: Sepsis. Septic encephalopathy. Dexmedetomidine. α_2 adrenergic receptor.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 DEFINIÇÃO DA SEPSE.....	10
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE.....	11
1.3 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE.....	13
1.4 ENCEFALOPATIA SÉPTICA E ATIVAÇÃO MICROGLIAL.....	15
1.5 RECEPTORES $\alpha 2$ ADRENÉRGICOS.....	17
1.6 DEXMEDETOMIDINA.....	20
1.7 DEXMEDETOMIDINA E NEUROPROTEÇÃO.....	22
1.8 IDAZOXANO.....	26
2 JUSTIFICATIVA.....	28
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 METODOLOGIA.....	31
4.1 ANIMAIS.....	31
4.2 INDUÇÃO DE SEPSE E TRATAMENTOS.....	31
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	32
4.4 NÍVEIS DE CITOCINAS.....	33
4.5 ATIVAÇÃO MICROGLIAL.....	33
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTT.....	34
4.7 PCR.....	35
4.7.1 Extração de RNA Total.....	35
4.7.2 Determinação da pureza do RNA.....	35
4.7.3 Síntese do cDNA.....	35
4.7.4 Desenho dos primers.....	35
4.7.5 Reações de qPCR.....	36
4.8 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTAMATO POR HPLC.....	36
4.9 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	37
4.9.1 Habituação à campo aberto.....	38
4.9.2 Reconhecimento de novos objetos.....	38
4.9.3 Esquiva inibitória.....	39

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 EXPRESSÃO DE RECEPTORES α -2 _A e α -2 _C ADRENÉRGICOS POR PCR EM 24HS, 10 E 30 DIAS PÓS-TRATAMENTO	41
5.2 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO CEREBRAL E SISTÊMICA.....	42
5.3 ATIVAÇÃO MICROGLIAL.....	47
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTAMATO POR HPLC.....	49
5.5 NÍVEIS PROTEICOS DE BAX e Bcl-2.....	50
5.6 NÍVEIS PROTEICOS DE PSD-95.....	54
5.7 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	55
5.7.1 Comportamento: 10 dias após os tratamentos.....	55
5.7.2 Comportamento: 30 dias após os tratamentos.....	57
5.8 SOBREVIVÊNCIA.....	59
5.9 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL (TRATAMENTO TARDIO)	60
5.9.1 Comportamento logo após os tratamentos.....	60
5.9.2 Comportamento 30 dias após sepse.....	62
5.10 ATIVAÇÃO MICROGLIAL (TRATAMENTO TARDIO)	64
6 DISCUSSÃO.....	66
7 CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO DA SEPSE

A sepse é considerada uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção. O choque séptico é considerado sepse acompanhada por profundas anormalidades circulatórias e celulares/metabólicas capazes de aumentar a mortalidade substancialmente. Os critérios clínicos para sepse são: suspeita ou certeza de infecção e um aumento agudo de ≥ 2 pontos no Score de Avaliação Sequencial de falência de órgãos (SOFA) em resposta a uma infecção (representando disfunção orgânica). Para choque séptico é necessário a presença de sepse acompanhado 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 (Singer et al., 2016; Shankar-Hari et al., 2016).

A definição exata da sepse, bem como seu diagnóstico clínico tem sido debate entre diversos estudiosos ao longo dos anos. Uma conferência realizada em 2016, organizada pela *Society of Critical Care Medicine* e pela *European Society of Intensive Care* teve como objetivo atualizar a definição de sepse e choque séptico. Enfatizaram que a infecção na ausência de disfunção de órgãos, hipotensão e hipoperfusão é clinicamente diferente de sepse ou choque séptico, não necessitando assim de uma abordagem terapêutica tão agressiva (Scott, 2017).

Não existe um consenso sobre o quadro clínico de pacientes sépticos, e nenhum teste que demonstre uma sensibilidade e especificidade para detectar tal doença, já que ela apresenta um caráter complexo, podendo ser desencadeada a partir de diversos focos e micro-organismos e podendo acometer grupos heterogêneos de pacientes, apresentando idades diferentes, sinais e sintomas clínicos variados e diferentes perfis e históricos (Vincent, 2009). A fim de padronizar a avaliação da disfunção orgânica, foi proposto que se utilizasse o escore SOFA, que expressa em valores numéricos o grau de comprometimento ou anormalidade na função de órgãos específicos, de acordo com alguns parâmetros medidos. Este escore foi o proposto (Figura 1), já que é o menos complicado, mais amplamente utilizado e apresenta uma melhor predição sobre mortalidade em pacientes da UTI. Portanto foi o selecionado como a melhor ferramenta para definição de disfunção orgânica. Neste, os pacientes que apresentassem um aumento de dois ou mais pontos acima da linha de base seriam classificados como tendo uma disfunção orgânica (Singer et al 2016). Escores como SOFA devem ser medidos em todos os pacientes admitidos na UTI, para auxiliar na determinação do nível de acuidade e risco de mortalidade,

auxiliando no diagnóstico e com a finalidade de desenvolver um tratamento adequado ao paciente.

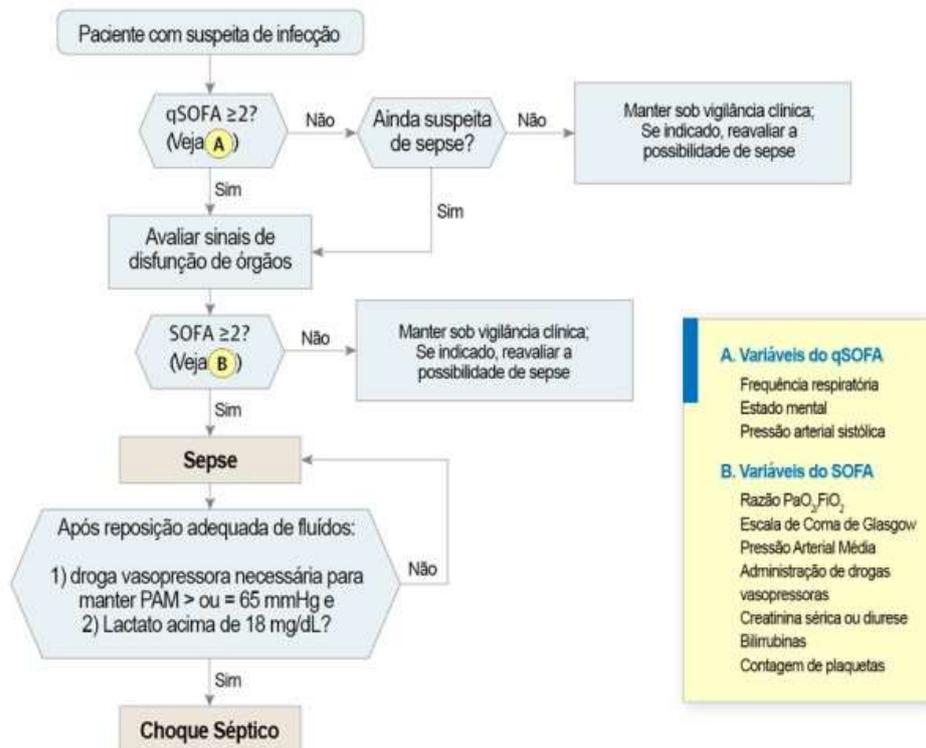


Figura 1: Critérios clínicos para diagnóstico de sepse e choque séptico. Fonte: Adaptado de Singer et al. 2016.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE

Sepse e choque séptico estão entre os maiores problemas de saúde, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. Segundo Reinhart (2013), a sepse é avaliada como uma das doenças mais fatais e de acordo com Silva (2011) é considerada uma das principais causas de morte em UTIs. Sendo que a América Latina apresenta os maiores índices de prevalência de infecção e de taxas de mortalidade (Vincent et al., 2009).

A sepse e choque são as causas mais comuns de morte entre pacientes criticamente enfermos, ocupando cerca de 10% das internações em UTIs (Brun-Buisson et al., 2004) e são responsáveis pela maior parte dos gastos com cuidados de saúde no mundo todo (Angus et al., 2001). Através da base de dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), Michelin e Reis (2016) constataram que no Brasil cerca de R\$ 400 milhões foram

gastos no ano de 2015 com os pacientes sépticos. E um estudo realizado por Torio (2013) demonstrou que a sepse é a condição mais cara tratada em hospitais e que levou a um gasto de 20,3 bilhões de dólares, ou 5,2% do gasto total das hospitalizações dos Estados Unidos em 2011. Segundo a *Agency for Healthcare Research and Quality* o custo com pacientes hospitalizados com esta condição aumentou cerca de 11.9% ao ano de 1997 até 2008.

A organização mundial da saúde (OMS) (2017) estima que ocorrem até 31 milhões de casos por ano, sendo que cerca de 24 mil pessoas morrem de sepse no mundo por dia, totalizando uma perda de mais de 8 milhões de vidas por ano (Hall et al., 2011; Adhikari et al., 2010). A verdadeira incidência é presumivelmente muito maior (Angus e Van der Poll, 2013). No Brasil, segundo o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), em 2015 a mortalidade em hospitais privados causados pela sepse era de 34,5% e para hospitais públicos de 57,6%. E estudos de Moreno (2006) e Kauss (2010) apontaram o Brasil como um dos países com maiores índices de sepse e conseqüentemente apresentando uma das maiores mortalidades de pacientes sépticos em UTI.

Além da alta mortalidade, cerca de 20 a 50% entre pacientes gravemente afetados (Wood, Angus, 2004), a sepse ocasiona redução significativa na qualidade de vida dos pacientes sobreviventes, sendo estes mais suscetíveis a danos permanentes em órgãos (Chang et al., 2010), comprometimento físico, psicológico e cognitivo a longo prazo (Iwashyna et al., 2010). Sabe-se que pacientes que sobrevivem a sepse permanecem com maior risco de morte, frequentemente sofrem com transtornos de humor e baixa qualidade de vida (Angus e Van der Poll, 2013). A sepse pode levar a um distúrbio no sistema imune do paciente, o deixando mais vulnerável a futuras infecções, podendo acarretar em aumento do risco de mortalidade, mesmo anos após o episódio (Yende, Angus, 2007; Yende et al, 2014).

Devido aos números alarmantes de morbimortalidade causados por esta condição, houve uma maior conscientização e maior preocupação com as sequelas desencadeadas através desta doença e percebeu-se a necessidade de tratar o quanto antes o paciente e de desenvolver métodos de diagnósticos precoces para um desenrolar mais efetivo do caso clínico (Angus e Linde-Zwirble, 2004; Sales Junior, 2006). Através da adoção de sistemas de diagnóstico precoce e tratamento emergencial padronizado, é possível reduzir os índices de mortalidade pela sepse (Ferrer et al., 2008; Barochia et al., 2010). Contribuindo para tais feitos, o ILAS, desenvolveu uma campanha que objetiva criar modelos de condutas relacionadas ao cuidado de pacientes sépticos e em 2017, só no Brasil, 130 centros estavam envolvidos nesta campanha. Percebe-se que houve um aumento na incidência da sepse, mas este fato pode estar atrelado não

só pela população estar mais consciente sobre esta condição, como também com o aumento da população idosa, juntamente com a presença mais expressiva de pacientes que apresentam morbidades associadas, como por exemplo a imunossupressão, doença pulmonar obstrutiva crônica, muitos tipos de câncer, uso frequente de antibióticos e aumento da frequência de procedimentos invasivos (Angus et al., 2001; Martin et al., 2003; Rangel-Frausto, 2005; Walkey et al., 2015).

Um estudo multicêntrico conduzido pelo ILAS, o Sepsis Prevalence Assessment Database in Emergencies Department (SPREAD), avaliou a prevalência e a letalidade por sepse e choque séptico em UTIs brasileiras. Sendo que 277 UTIs participaram do questionário, mostrando que, principalmente nas regiões Nordeste e Amazônica e em hospitais públicos, existe uma baixa disponibilidade de alguns itens para tratar a sepse. Este estudo mostrou também que 1/3 dos leitos de UTI do país estão ocupados com pacientes com sepse e choque séptico. De acordo com Quintano Neira et al. (2018) de 2006 a 2015, a incidência anual de sepse passou de 31,5/100.000 para 47,4/100.000 pessoas, representando uma mortalidade de 50,5%. A mortalidade na região Sudeste foi de 51.2%, Centro-Oeste: 70%, Nordeste: 58.3, Sul: 57.8% e Norte: 57.4%. Essa letalidade é bem menor em países desenvolvidos. No Brasil, Sales Júnior et al. (2006) realizou um estudo em UTI's de todas as regiões do Brasil, onde foram identificados 521 pacientes com sepse ou choque séptico, sendo que a mortalidade geral dos pacientes sépticos foi de 46,6 % (243 pacientes) e dos pacientes com choque séptico, a mortalidade foi de 65,3 %.

1.3 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

O começo do processo fisiopatológico da sepse se dá a partir da invasão de um hospedeiro, mais frequentemente por bactéria e uma menor extensão por fungos e vírus (Steven et al., 2017), liberando diversos compostos, como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos e exotoxinas, que podem invadir a circulação sistêmica (Karima et al., 1999). Receptores proteicos transmembranares, como o *Toll-like* (TLR) irão reconhecer este agente microbiano a partir de suas estruturas celulares. Por exemplo, o LPS presente na parede celular de bactérias gram-negativas pode ser reconhecido pelo TLR4, onde irá ativar uma resposta imune a fim de combatê-lo (Figura 2), levando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral- α (TNF α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) favorecendo uma

intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de granulócitos (Braun-Fahrlander et al, 2002; Gehring et al., 2002; Schwartz, Cook, 2005).

Estes receptores podem ser encontrados em células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e através deste reconhecimento pode levar a indução da síntese de citocinas pro e anti-inflamatórias, promovendo o recrutamento de leucócitos e outros macrófagos para o local da infecção (Goldman, 2007; Kawai, Akira, 2010; Ferraz et al., 2011). A produção de citocinas, a princípio, leva ao combate da infecção, mas podem ocasionar alguns danos característicos da sepse. A produção de excessiva de TNF- α , IL-1 β e de óxido nítrico pode acarretar em indução de dano microvascular, falência cardiovascular, bem como lesão inicial da barreira hematoencefálica (BHE). Pode apresentar citotoxicidade direta ou indireta aos neurônios devido a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), promovendo a peroxidação lipídica, dano no DNA e inativação de proteínas (Delanty, Dichter, 1998; Baumgarten, 2001; Knuefermann, 2002; Krebs, 2005; Ferraz et al., 2011).

Com o objetivo de destruir o agente invasor, a liberação de EROs e de espécies reativas de nitrogênio (ERN) através de neutrófilos, inicialmente tem um papel de defesa. Porém, se ocorrer uma ativação demasiada de receptores associados a inflamação, proporcionará uma resposta inflamatória sistêmica, aumentando ainda mais a liberação de mediadores inflamatórios. Desta maneira gera um desequilíbrio entre os mecanismos oxidantes e antioxidantes do organismo, desenvolvendo o quadro conhecido como estresse oxidativo, que pode provocar desde danos até morte celular (Salvemini, Cuzzocrea, 2002; Halliwell, Gutteridge, 2007; Alves-Filho et al., 2008).

Paralelo a isso é notável a presença de ativação microglial em pacientes com sepse. Muitos estudos já têm relatado a ativação de microglia tanto em experimentos com animais como em pacientes (Gordon et al., 2003; Iwashyna et al., 2010; Shah et al., 2015). Eventos fisiopatológicos da sepse e de outras doenças como isquemia estão intimamente associados com o aumento do recrutamento e infiltração de leucócitos circulantes, provocam inflamação local no cérebro e contribuem para uma maior permeabilidade da BHE e degeneração celular endotelial (Denes et al., 2010). Leucócitos aderentes e infiltrados liberam mediadores inflamatórios neurotóxicos e EROs e ativam células gliais e portanto, a integridade vascular se torna ainda mais prejudicial (Anrather et al. 2011). As células endoteliais ficam expostas a citocinas produzidas localmente e tornam-se reativas, facilitam a ativação e o recrutamento de leucócitos que circulam através de regulação positiva de moléculas de adesão no lado luminal de vasos.

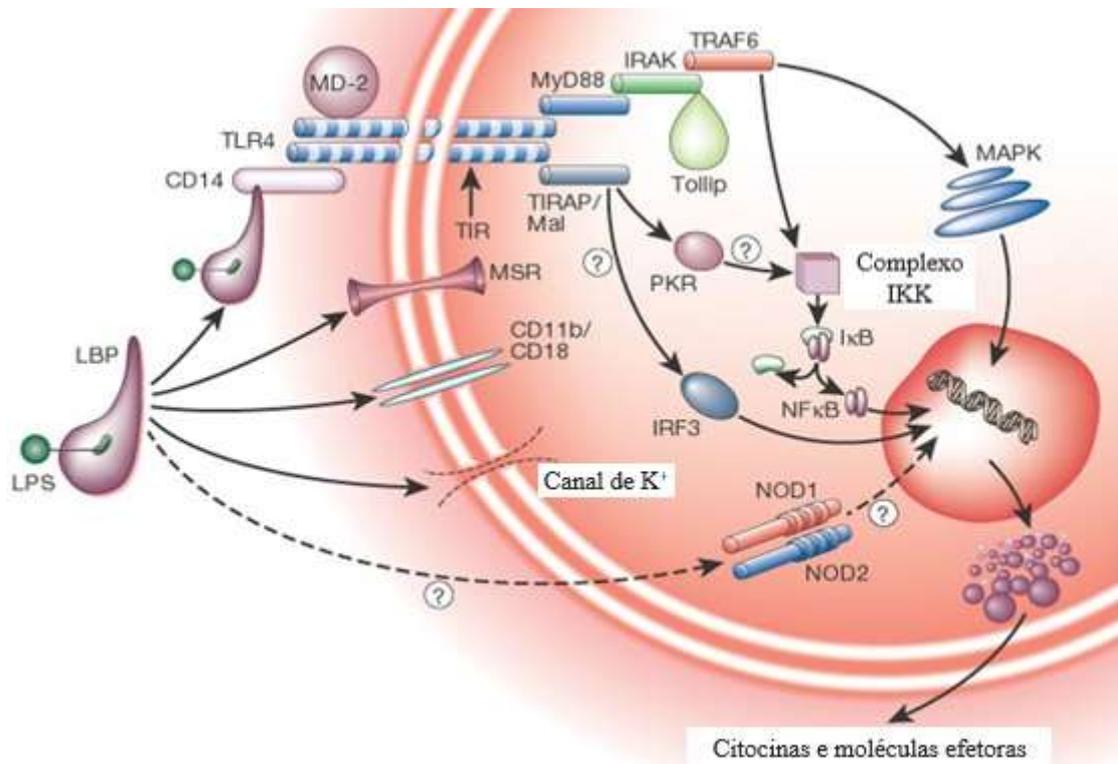


Figura 2: Mecanismos fisiopatológicos da sepse. Após o reconhecimento do lipopolissacarídeo pelo receptor Toll-like 4, uma cascata é ativada levando a produção de citocinas e quimionas pelo fator de transcrição nuclear NFκB. Fonte: Adaptado de Cohen J; 2002.

1.4 ENCEFALOPATIA SÉPTICA E ATIVAÇÃO MICROGLIAL

A resposta inflamatória sistêmica, característica da sepse, leva a produção de mediadores pro e anti-inflamatórios, disfunção endotelial, estresse oxidativo, falência microvascular, disfunção da BHE, afetando o SNC, culminando em morte celular (Ringer et al., 2011; Sharshar et al., 2005), promovendo sintomas neurológicos como a perda de funções cognitivas e lesões cerebrais (Ziaja, 2012; Dal-Pizzol et al., 2014). Diversos estudos mostram que sobreviventes de sepse apresentam incapacidade cognitiva a longo prazo, incluindo alterações na memória, atenção e concentração (Hopkins et al., 2005; Iwashyna et al., 2010; Shah et al., 2013).

O quadro de Encefalopatia Séptica (ES) é caracterizado por uma disfunção cerebral causado por uma resposta sistêmica a uma inflamação, sendo necessária a exclusão de uma infecção direta ao cérebro. Ela gera alteração de consciência, que varia entre levemente reduzida, falta de resposta e até coma. A presença desta condição influencia negativamente a

sobrevivência dos pacientes sépticos, já que a disfunção cerebral que ocorre durante a sepse pode afetar diversos sistemas, uma vez que o cérebro está envolvido em controlar diversos órgãos. Causando assim não somente dano cerebral, como alteração de consciência, mas também pode gerar disfunções em sistemas neuroendócrinos e autônomos (Cotena et al., 2012). De acordo com Hopkins (2005) cerca de 46 a 70% dos pacientes sépticos no primeiro ano desenvolvem disfunção cognitiva de longo prazo e 25% dos pacientes são diagnosticados nos seis anos seguintes.

Ainda não se sabe exatamente quais os mecanismos por trás dos danos neurológicos de sobreviventes da sepse, mas uma das hipóteses inclui a neuroinflamação (Petronilho et al., 2012; Biff et al., 2013). Michels et al., (2017) apontam que a sepse tem sido associada a eventos prejudiciais do SNC e sugere que existe uma estreita ligação entre a sepse e neuroinflamação e que durante a evolução da sepse, supõe-se que a microglia possa exercer efeitos neurotóxicos e de reparação, dependendo do fenótipo microglial específico assumido.

Durante uma inflamação sistêmica, o estresse oxidativo e liberação de citocinas inflamatórias, poderiam levar à ruptura da barreira hematoencefálica e conseqüentemente causar danos no SNC, gerando mudanças anatômicas e comportamentais (Comim et al., 2011; Mina et al., 2014; Schwalm et al., 2014). De acordo com Lamar et al. (2011) e Zhang et al. (2012), a ES pode ocorrer em até 70% dos pacientes com sepse e caracteriza-se por apresentar um início abrupto no comprometimento cognitivo e por gerar disfunção cerebral difusa. Um estudo de Michels et al. (2014) aponta que o desenvolvimento da disfunção cognitiva após a sepse está relacionado a produção de danos oxidativos, inflamação no hipocampo e ativação da micróglia, sendo que Mina et al. (2014), estudaram o papel de $1L-1\beta$ na produção da inflamação e estresse oxidativo e sugerem um mecanismo semelhante.

Colaborando com esta hipótese, outros pesquisadores descrevem que pode ocorrer a permeabilidade das barreiras cerebrais permitindo assim a entrada de mediadores inflamatórios e fatores neurotóxicos ao cérebro, ativando a microglia, células imunes do cérebro, que podem levar a produção de óxido nítrico, citocinas e EROs, resultando em morte celular em áreas como o hipocampo e o córtex pré-frontal (Sonneville et al., 2013; Da Fonseca et al., 2014; Sankowski et al., 2015). Diversos fatores podem contribuir para ativação microglial e conseqüente comprometimento cognitivo a longo prazo, como por exemplo níveis elevados de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Girard et al., 2010; Van Griensven, 2014), maior expressão da proteína *high mobility group box 1* (HMGB1) e S100B no sangue periférico dos pacientes sépticos (Singh et al., 2015), que levam a

consequente ativação da via NF-kB por estes peptídeos. Estas vias contribuem para o aumento da produção de mediadores inflamatórios e compostos neurotóxicos no cérebro (Meneghini et al., 2013), que interferem nas sinapses, alterando a composição dos neurônios, prejudicando a plasticidade e eventualmente causando perda de sinapses. Além disso, TNF- α , IL-1 β são associadas ao desenvolvimento de apoptose neuronal (Figura 3) e diminuição de *Long Term Potentiation* (LTP), um fenômeno relacionado ao fortalecimento da transmissão de sinais entre neurônios, um dos mecanismos responsáveis pela aprendizagem e memória (Wilson et al., 2002; Lynch et al., 2010). Segundo Dong et al., (2017), a citocina IL-1 β induz ativação microglial, o que causa uma liberação excessiva de glutamato, fazendo com que haja um aumento da expressão do receptor NMDA e sobrecarga de cálcio intracelular, ocasionando estresse de retículo, contribuindo para o fenômeno de apoptose neuronal.

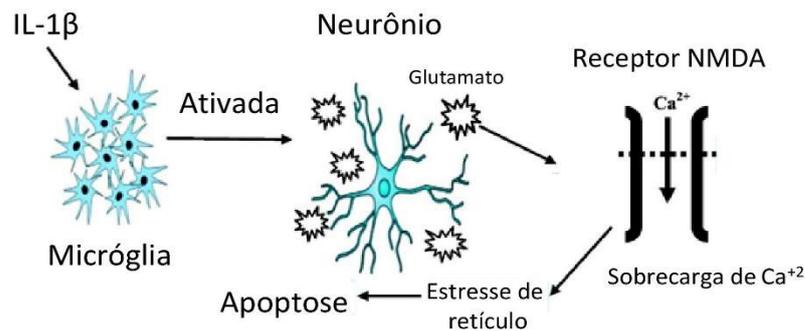


Figura 3: Citocina pró-inflamatória ativa micróglia, levando a liberação excessiva de glutamato, que através do receptor NMDA, induz o estresse de retículo, acarretando em apoptose. Fonte: Adaptado de Dong et al., (2017).

1.5 RECEPTORES $\alpha 2$ -ADRENÉRGICOS

Receptores adrenérgicos, ou adrenoceptores, são receptores ligados à proteína G e endogenamente são ativados por catecolaminas, como adrenalina e noradrenalina. São encontrados em diferentes regiões do sistema nervoso, tanto central como periféricamente, além de órgãos como rim, fígado e pâncreas (Hayashi et al., 1993). Existem cinco principais subtipos de receptores adrenérgicos que podem ser diferenciados de acordo com algumas propriedades farmacológicas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ (Zhong e Minneman, 1999). Os $\alpha 1$ - adrenoceptores são acoplados a proteína G_q , que ativam fosfolipase C, aumentando concentração cistólica de Ca^{+2} , os $\alpha 2$ - adrenoceptores são acoplados a proteína G_i e inibem a enzima adenilato ciclase,

diminuindo os níveis de AMPc, diminuindo a liberação de neurotransmissores, entre eles noradrenalina e glutamato (Chen et al., 2013), já os β - adrenoreceptores, ativam a via da proteína G_s , ocasionando aumento da atividade de AMPc (Figura 4) (Limbird, 1988; Berridge, 2009; Callera et al., 2004). Todos eles são primariamente receptores pós-sinápticos, com excessão do α_2 , que pode ser tanto pre como pós-sináptico. Os receptores pré-sinápticos, são auto-receptores que quando estimulados, atenuam a atividade noradrenérgica, através do mecanismo de *feedback* negativo (Coull, 1994). Já os pós-sinápticos, que estão localizados na musculatura lisa, quando ativados promovem a vasoconstrição (Hayashi et al., 1993).

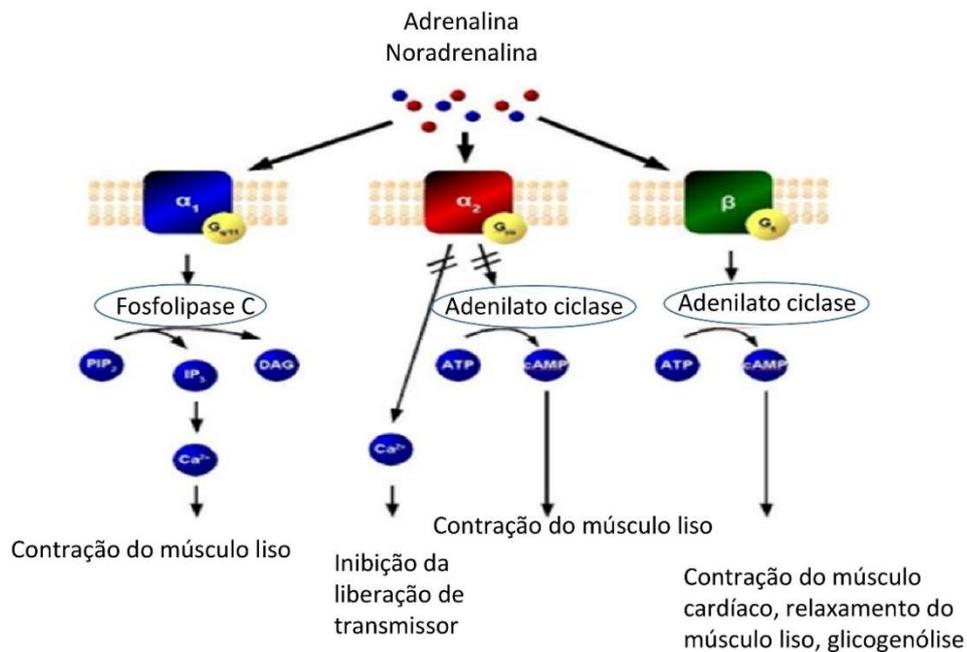


Figura 4: Resposta dos receptores adrenérgicos à ligação de adrenalina e noradrenalina. Adaptado de: Görnemann et al.,(2008).

A resposta da ligação de um agonista a um receptor adrenérgico vai depender do tipo de receptor, do agonista, dose e tecido (Alquist, 1948), na maioria das vezes irá causar uma resposta simpática, de luta ou fuga, frequência cardíaca aumentada, pupilas dilatadas, mobilização de energia e o fluxo sanguíneo desviado de órgãos não-essenciais para o músculo esquelético. Em paradoxo, quando ativados, os receptores α_2 , que são associados a uma proteína G_i , ocasiona uma diminuição de AMPc, que pode ocasionar, por exemplo, em relaxamento da musculatura lisa, devido a inibição da resposta simpática. Desta maneira os

agonistas α_2 -adrenérgicos apresentam propriedades analgésicas, de sedação e podem apresentar efeito anti-hipertensivo (Kamibayashi et al., 2000).

Os receptores α_2 -adrenérgicos, por atuarem tanto pre como pós-sinápticos, possuem respostas diferentes dependendo do local de atuação, se a ligação do agonista ocorrer com receptores pré-sinápticos do SNC, ocorrerá uma diminuição da função simpática através da regulação inibitória da noradrenalina, ocasionando efeitos simpatolíticos. Já a ligação em receptores pós-sinápticos está associada a contração da musculatura lisa, principalmente a contração dos vasos sanguíneos (Frohlich, 1980). O que determina este local de ligação é a dose utilizada do agonista. Estudos demonstram que, em menores doses, os receptores pré-sinápticos são ativados, levando a diminuição de noradrenalina, já em altas doses, a ligação ocorre com os receptores pós-sinápticos e irá aumentar a função noradrenérgica nos vasos sanguíneos (Ong et al., 1992; Starke et al., 1975; Svensson et al., 1975).

Estudos farmacológicos definiram a existência de três subtipos de receptores α_2 adrenérgicos, denominados $\alpha\text{-}2_A$, $\alpha\text{-}2_B$ e $\alpha\text{-}2_C$ (Regan e Cotecchia, 1992; Bylund et al., 1992; Coursin et al., 2001), onde $\alpha\text{-}2_A$ e $\alpha\text{-}2_C$ são pré-sinápticos e $\alpha\text{-}2_B$ é pós-sináptico. Os receptores $\alpha\text{-}2_A$ estão relacionados a analgesia, sedação, neuroproteção, os $\alpha\text{-}2_B$ à diminuição de tremores, vasoconstrição e analgesia da medula espinhal, já os $\alpha\text{-}2_C$, com a regulação de adrenalina na medula adrenal e mediação do processo sensitivo cognitivo (Panzer et al., 2009). MacDonald e Scheinin (1995) mapearam as regiões cerebrais que codificam mRNA dos três subtipos de receptores α_2 e demonstraram que os $\alpha\text{-}2_A$ estão localizados por todo o cérebro, principalmente no *locus coeruleus*, região onde encontra-se os corpos celulares de neurônios noradrenérgicos ascendentes e descendentes, $\alpha\text{-}2_B$ encontrado apenas no tálamo e $\alpha\text{-}2_C$ que foi encontrado em um maior número de regiões com maior destaque para os gânglios da base (Figura 5).

Algumas evidências em modelos animais de isquemia sugerem que a ativação de receptores $\alpha\text{-}2$ adrenérgicos possam exercer papel protetor na lesão neuronal e clinicamente um agonista seletivo destes receptores (dexmedetomidina) reduz disfunção cerebral em pacientes criticamente enfermos. Outros agonistas dos receptores α_2 , como a clonidina, também apresentaram características neuroprotetoras (Dean et al., 2008). Virtanen et al (1988) e Ma et al (2004a) afirmam em seus estudos que os efeitos neuroprotetores da dexmedetomidina são exclusivamente mediados pelos receptores $\alpha\text{-}2_A$.

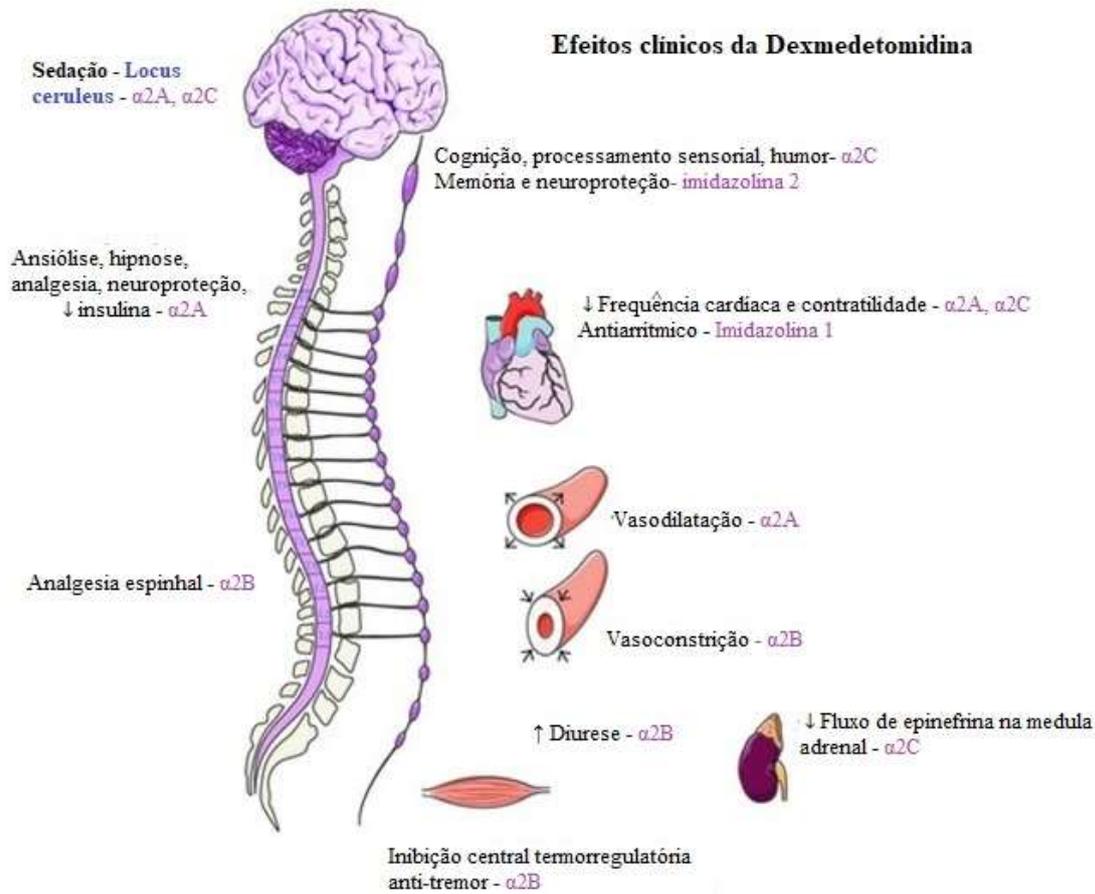


Figura 5: Efeitos clínicos induzidos pelo uso da Dexmedetomidina em diferentes regiões, de acordo com os receptores envolvidos: α -2_A, α -2_B e α -2_C adrenérgicos e Imidazolina 1 e 2. Adaptado de: Bulow et al., (2014).

1.6 DEXMEDETOMIDINA

Dexmedetomidina (DEX), é um agonista altamente seletivo e potente do receptor α 2-adrenérgico, usado amplamente na clínica médica como um sedativo para pacientes em tratamento na UTI, salas de cirurgia ou para procedimentos diagnósticos, fornecendo não somente a sedação, como também efeitos analgésicos e ansiolíticos (Bhana et al., 2000; Carollo et al., 2008; Hoy et al., 2011).

É uma molécula lipofílica, com alta ligação a proteínas plasmáticas, com grande volume de distribuição e rapidamente redistribuída para tecidos periféricos. Apresenta meia-vida de distribuição de 6 minutos e mostra uma farmacocinética linear em um período de 24 horas em pacientes com função hepática e renal normais (Kaur et al., 2011). Tem uma meia-

vida de eliminação de aproximadamente 2 horas, através do metabolismo hepático e é secretada primariamente pela urina e uma pequena quantidade pelas fezes (Burbulys et al., 2011). A princípio, a DEX era utilizada somente para intervenções de curto prazo, pelo histórico de efeito rebote da clonidina, também agonista dos receptores α -2, onde a descontinuação da sua utilização após uso prolongado causava um aumento da pressão e taquicardia, porém anesthesiologistas apontam que mesmo com o uso prolongado em UTIs, a DEX não demonstrou este efeito reverso (Nguyen et al., 2017).

Apresenta relação de seletividade entre α -2 para α -1 de 1600:1, agindo no *locus coeruleus*, núcleo noradrenérgico do SNC, modulando o estado de vigília e produção de analgesia (Dick et al., 1993). Aprovado para utilização em humanos em 1999 pela *Food and Drug Administration* (FDA), possui ação sedativa dose-dependente, podendo deixar o paciente sonolento e responsivo, até uma sedação mais profunda, porém, mesmo nas doses mais altas, tem se mostrado seguro, principalmente por apresentar depressão respiratória mínima (Ebert et al., 2000; Hall et al., 2000). Outras vantagens deste medicamento é que ele apresenta um rápido início de ação, oferece sinergismo com outras drogas anestésicas já utilizadas e apresenta baixa incidência de efeitos colaterais (Bagatini et al., 2002).

Evidências sugerem que DEX apresenta efeitos anti-inflamatórios em pacientes com sepse (Memis et al., 2007; Yang et al., 2015) e que durante a inflamação sistêmica pode impedir a neuroinflamação hipocampal, superexpressão de TLR-4 na micróglia e disfunção cognitiva mediada pela via de sinalização α 2-adrenoceptor (Yamanaka et al., 2016). Zhang et al (2015), demonstrou que na micróglia, DEX inibe a alta expressão de citocinas pró-inflamatórias, acumula óxido nítrico (NO) e diminui a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), impedindo a ativação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK). Já em um estudo de Chen et al (2015), DEX foi capaz de reduzir a mortalidade de animais submetidos a sepse, além de aliviar danos patológicos no tecido intestinal e diminuir níveis de expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e TLR4 no intestino. Xu et al (2015) demonstrou que a DEX apresenta efeitos anti-inflamatórios e Jiang et al (2014) encontrou níveis diminuídos de mieloperoxidase (MPO) em pulmões e fluído do lavado broncoalveolar. Estudos prévios também demonstraram a diminuição de NF-kB em pulmão, tecido miocárdio e lavado broqueoalveolar (Kong et al., 2017; Wu et al., 2013; Jiang et al., 2014) e de GFAP e CD11b no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de fratura tibial e tratados com DEX (Zhu et al., 2016).

Em humanos, os efeitos anti-inflamatórios deste sedativo se mostraram presentes tanto quando aplicado antes de cirurgias, quanto depois (Chen et al., 2015). Além destes evidentes

efeitos inflamatórios, o uso do DEX vem sendo apontado como um potencial agente terapêutico para o tratamento do *delirium* na UTI (Peng et al., 2013) e podem reduzir risco de desfechos cognitivos em pacientes que necessitam de cuidados intensivos ou pós-operatório (Guo et al., 2015; Liu et al., 2016). Su et al (2016) avaliaram a incidência de *delirium* em 350 pacientes no pós-operatório, sendo a incidência menor no grupo tratado com DEX (9%) do que no grupo que recebeu placebo (23%), demonstrando resultados promissores, uma vez que o *delirium* pós-operatório está relacionado ao aumento do tempo de hospitalização, duração da ventilação mecânica, comprometimento cognitivo a longo prazo, complicações e consequentemente mortalidade dos pacientes (Pratico et al., 2005).

Corroborando com este estudo, Riker et al (2009) realizou um estudo em UTIs e a redução de *delirium* foi de 20% em pacientes que utilizaram a DEX e os pacientes foram removidos de ventilação mecânica quase dois dias mais cedo que o esperado, reduzindo, portanto, o risco de infecções associadas a UTI. Hofer et al. (2009), também demonstrou que o uso preventivo da DEX em um modelo de sepse diminuiu mortalidade, apoiando o raciocínio para considerar o uso de α 2-adrenérgico em pacientes de alto risco antes de serem submetidos a grandes cirurgias, e pacientes internados em UTI propensos à sepse. Contribuindo com estes efeitos clínicos positivos em relação a este medicamento, um estudo demonstrou que pacientes cirúrgicos que receberam DEX, apresentaram declínio cognitivo menor, uma semana após a cirurgia, quando avaliado escore *Mini-Mental State Examination* (MMSE) em relação àqueles pacientes controles (Chen et al., 2012). Outra vantagem clínica demonstrada, foi a diminuição de estresse cirúrgico, através da diminuição da estimulação simpática (Dyck et al., 2000).

1.7 DEXMEDETOMIDINA E NEUROPROTEÇÃO

Agentes anestésicos e sedativos, têm sido associados à alteração de transmissões sinápticas, que acabam por deprimir a comunicação neuronal (Franks et al., 1994). O midazolam, que age amplificando o efeito inibitório do receptor GABA_A e a cetamina, um antagonista dos receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), já demonstraram induzir neurodegeneração apoptótica em camundongos (Young et al., 2005). Diversas pesquisas estão sendo feitas para encontrar um anestésico que além de exercer seu efeito principal de anestesia, ainda apresente um efeito neuroprotetor. Até o momento o xenônio foi o mais eficiente em proporcionar ambas, porém por ser um gás nobre raro, é proibido para utilização rotineira (Lima et al., 2011). Evidências sugerem que o uso da DEX como agente

sedativo vem apresentando resultados promissores em relação a neuroproteção e que poderia estar relacionado ao balanço entre proteínas pro e anti-apoptóticas (Engelhard et al., 2008; Petroz et al., 2006; Nelson et al., 2003), desta maneira a única medicação disponível que apresenta um efeito neuroprotetor aparente é a DEX.

Apesar do mecanismo da neuroproteção associada ao uso deste medicamento não estar elucidado, alguns estudos vêm apontando sua eficácia. Estudos pré-clínicos tanto *in vitro* quanto *in vivo* demonstraram que a DEX apresenta propriedades neuroprotetoras (Degos et al., 2013; Li et al., 2014). Em um modelo de lesão cerebral, realizado durante o desenvolvimento do SNC, a DEX se mostrou importante em prevenir os efeitos neurotóxicos induzidos por isoflurano (Sanders et al., 2009), assim como no estudo de Schoeler et al., (2012), a DEX apresentou efeitos neuroprotetores e que a ativação da ERK poderia estar envolvida em mediar este efeito. Já em um estudo de Liao et al (2014), os resultados demonstraram que a neuroproteção da DEX contra danos causados por isoflurano envolvem as vias da JNK e p38, mas não da ERK. Tachibana et al (2012) confirmaram a relativa segurança do DEX no cérebro em desenvolvimento de filhotes de ratos, uma vez que não prejudicaram a atividade sináptica no hipocampo, promovendo evidências adicionais a favor do uso de DEX em anestésias pediátricas.

Através da sua ligação com receptores α_2 -adrenérgicos, promovem a diminuição da liberação de noradrenalina e glutamato na fenda sináptica, que são associados a vias de apoptose, toxicidade neuronal e lesão celular (Chen et al., 2000; Tenneti et al., 1998; Budd et al., 2000; Okamoto et al., 2002) (Figura 6). A hiperpolarização da membrana pré-sináptica, pela abertura de canais de potássio (K^+), ocasiona diminuição do influxo de cálcio (Ca^{+2}) para dentro da célula, o que levaria a uma diminuição da liberação destes neurotransmissores na fenda sináptica, ocasionando uma diminuição da ativação dos receptores NMDA pós-sinápticos, aumentando o bloqueio por Mg^{2+} e redução de Ca^{+2} intracelular e da taxa de disparos neuronais, ocasionando redução de morte neuronal excitotóxica (Janke e Samra, 2006).

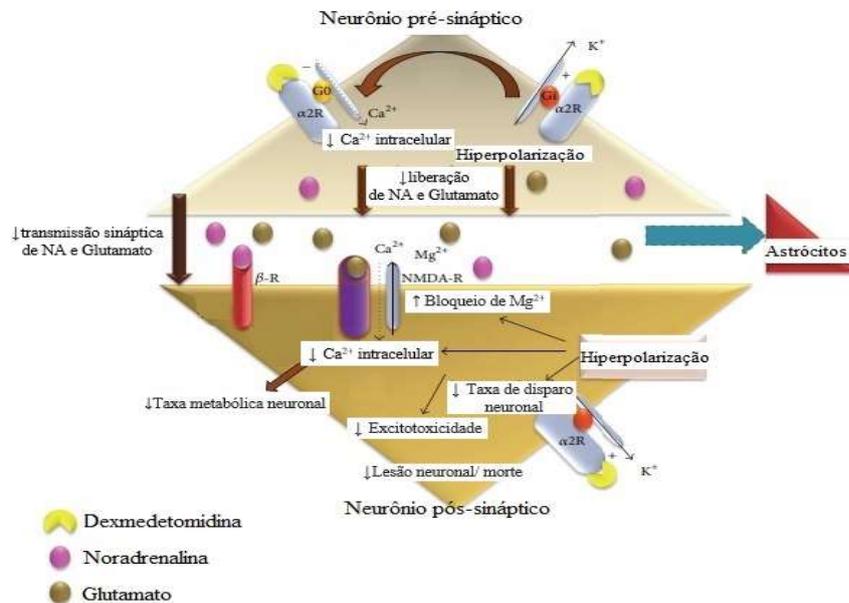


Figura 6: Influência da ligação Dexmedetomidina em receptores α_2 -adrenérgicos, na liberação de noradrenalina e glutamato. Após a ligação da DEX nos receptores α_2 -adrenérgicos, gera uma hiperpolarização da membrana pré-sináptica, levando a diminuição intracelular de Ca^{2+} , ocasionando consequente diminuição da liberações dos neurotransmissores noradrenalina e glutamato na fenda sináptica. Influenciando na diminuição da ativação dos receptores NMDA pós-sinápticos, aumento do bloqueio de Mg^{2+} , proporcionando a diminuição de disparo neuronal, excitotoxicidade e consequente morte neuronal.: Fonte: Adaptado de Janke, E. L. e Samra, S (2006).

Quando ativados, os receptores NMDA abrem canais que permitem que o Ca^{+2} entre para dentro da célula, em algumas partes do cérebro esta atividade é importante para o processo de LTP (Bliss e Lomo, 1973), mecanismo correlacionado ao aprendizado e formação da memória. E em condições normais de transmissão sináptica, este receptor de NMDA é bloqueado pelo Mg^{+2} e é apenas ativado em curtos períodos de tempo. Porém, em condições patológicas, a super ativação desse receptor, ocasiona o fenômeno conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica. Com isso, ocorre o excesso do influxo de Ca^{+2} (Figura 7), acarretando em sobrecarga das mitocôndrias, que leva a formação de EROs e ativação da via de caspases, proteínas responsáveis pela clivagem de diversos substratos celulares, culminando em morte celular (Sattler e Tymianski, 2000). Desta maneira através da diminuição da liberação de noradrenalina e glutamato na fenda sináptica, hipotetiza-se que levaria a regulação de vias apoptóticas, podendo aumentar linfoma 2 das células B (Bcl-2) e mdm-2, fatores anti-apoptóticos e diminuir BAX e p53, fatores pró-apoptóticos (Lipton S, 2004; Eldridge et al., 2015; Luo et al., 2011; Shu et al., 2014, Luchs et al., 2010; Patel et al., 2010).

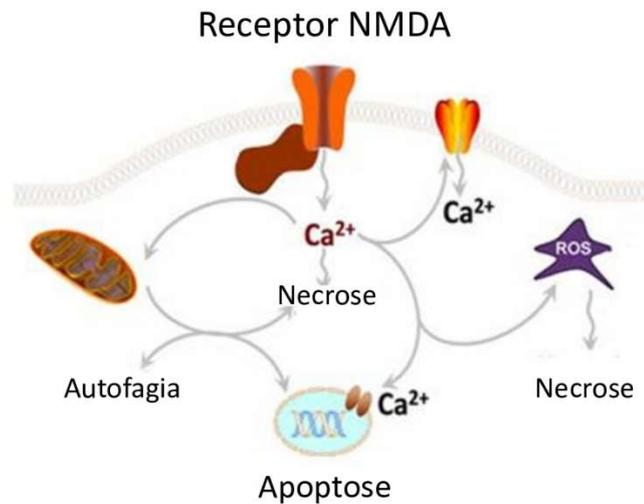


Figura 7: A relação do receptor NMDA e a via da apoptose. Através da utilização da DEX, esta pode levar a regulação da ativação de NMDA, através da diminuição da liberação de neurotransmissores (Noradrenalina e glutamato) e consequentemente influenciar na regulação da via da apoptose. Fonte: Adaptado de Shu et al., 2014.

Degos et al., (2013), demonstrou em seu estudo com ratos neonatos, que DEX poderia exercer efeitos neuroprotetores contra lesão induzida por glutamato através do aumento da expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) nos astrócitos (Figura 8) e que este efeito está relacionado a via da ERK $\frac{1}{2}$. Corroborando com estes resultados, Bell et al (2014) comprovou que o pré-tratamento com DEX, preservou função neurológica e atenuou lesão neuronal após oclusão da aorta torácica em camundongos, estes resultados foram relacionados a um aumento da fosforilação da proteína cinase B e CREB e regulação subsequente de Bcl-2 e BDNF. A fosforilação de CREB induzida por agonismo do receptor α -2 adrenérgico contribuiu para o mecanismo de proteção da DEX na medula espinhal após isquemia. Engelhard et al (2003), apontou que a administração de DEX aumenta a expressão diversas proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Mdm-2 no SNC após isquemia.

Em um estudo com ratos neonatos, Zhang et al (2019) demonstraram que a DEX na dose de 20ug/kg, foi capaz de promover uma melhora na memória e aprendizagem espacial, por promover a neurogênese e plasticidade sináptica, facilitando a expressão de proteínas associadas a sinapse, como PSD-95 e GAP43, através da ativação da via GDNF/NCAM/CREB. Em um estudo de Ebert et al (2000), pacientes saudáveis que receberam doses baixas de DEX, apresentaram uma preservação da memória. Mirski et al (2010) e Goodwin et al (2013)

demonstraram que diferentemente do propofol, a DEX preservou a função cognitiva em pacientes de UTI.

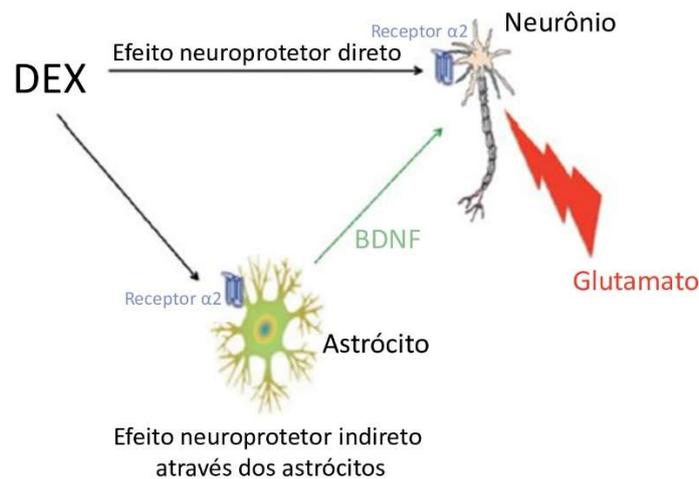


Figura 8: Esquema dos efeitos protetores de DEX mediados por astrócitos e neurônios. Fonte: Adaptado de Degos et al., 2013.

1.8 IDAZOXANO

Idazoxano (IDA), é um fármaco utilizado principalmente no âmbito de pesquisas científicas e práticas veterinárias para reversão de efeitos sedativos (Kallio-Kujala et al., 2018), apresenta também potencial para tratar diabetes e efeitos antidepressivos (Zhang et al., 2015). É um antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, que age nestes receptores bloqueando-os e promovendo efeitos contrários aos dos agonistas α_2 -adrenérgicos, potencializando a disponibilidade de noradrenalina, aumentando efeitos simpáticos (Colucci, 1984; Thomas e Holman, 1991). De acordo com Rankin (2015), assim como outros antagonistas, o IDA é capaz de reverter os efeitos da DEX, levando a perda dos efeitos de sedação e analgesia. Em altas doses pode ainda ocasionar efeitos colaterais como hipotensão, vômito, tremores e excitação (Andrade, 2004).

De acordo com Zhang et al., (2017), o uso da DEX foi capaz de aliviar a dor e mostrou pouca neurotoxicidade nos neurônios da medula espinhal, porém o efeito analgésico da DEX foi bloqueado pelo uso de IDA, indicando que o seu efeito se dá pelo receptor α_2 -adrenérgico.

Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo de Bell et al (2012), onde a administração da DEX antes de oclusão aórtica em camundongos, preservou funções neurológicas e que após a adição de um antagonista α_2 , esta proteção foi perdida, confirmando o papel deste receptor na proteção neuronal. O uso de baixas doses de um agonista α_2 -adrenérgico está associado a uma proteção neuronal, enquanto o uso de um antagonista α_2 -adrenérgico, como o IDA (1 mg/kg/h), está associado a um aumento da lesão neuronal no hipocampo (Dean et al., 2008, Dean et al., 2006). Em um modelo de Doença de Parkinson, a utilização de IDA induziu a expressão cortical de IL-1 β (McNamee et al., 2010b). Em estudo de Smith (1992), IDA prejudicou o desempenho da tarefa de raciocínio lógico, tarefa de processamento semântico e memória de reconhecimento.

Além de atuar como antagonista α_2 -adrenérgico, o IDA também possui alta afinidade pelos receptores imidazolina 1 e 2 (I₁ e I₂) e é um agonista parcial do receptor 5-HT_{1A}, porém os efeitos comportamentais do IDA se assemelham a de outros antagonistas α_2 que não possuem afinidade para I₁ e I₂, demonstrando que estes efeitos são mediados via antagonismo de α_2 -adrenoreceptores (Gomez-Mancilla e Bédard, 1993; Regunathan e Reis 1996). Apesar de estudos mostrarem que seu efeito antagonista em receptores α_2 adrenérgicos pode levar a perda da função neuronal, outros estudos apontam que IDA pode levar a neuroproteção através da diminuição de dano na BHE e proteger contra lesão medular em modelo de Esclerose Múltipla (EM), através de sua ligação com receptor de imidazolina 2 (Wang et al., 2009; Wang et al., 2014). Um estudo de Flamez et al (1997), aponta que o IDA apresenta igual afinidade para receptores de Imidazolina e α_2 adrenérgicos.

2. JUSTIFICATIVA

O conhecimento sobre as alterações fisiopatológicas que ocorrem no SNC após sepse ainda são poucas. Existe inflamação cerebral, ativação de micróglia levando a possíveis danos cognitivos. Nesse sentido, torna-se importante o estudo de mecanismos envolvidos no desenvolvimento destas alterações e ainda utilizar tal ferramenta farmacológica disponível clinicamente (dexmedetomidina) no intuito de tanto aumentar o conhecimento sobre a fisiopatologia, quanto avaliar se este fármaco é capaz de diminuir danos neurológicos em animais sobreviventes a sepse e facilitar a transição para a prática médica. Ainda como avaliar os efeitos da DEX principalmente no que se refere a neuroproteção, uma vez que este medicamento é um sedativo e que parece trazer resultados positivos em relação a neuroproteção. E avaliar também se o antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, IDA, é capaz de reverter efeitos benéficos ocasionados pela DEX.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o potencial efeito neuroprotetor da ativação de receptores α -2 adrenérgicos pela DEX administrada durante ou após indução de sepse em ratos machos adultos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Determinar a expressão de receptores α -2_{A,C} adrenérgicos por *polimerase chain reaction* (PCR) em diferentes regiões (pré-frontal, hipocampo e amígdala) do SNC em diferentes dias após a administração dos fármacos DEX e/ou IDA;
- 2 - Quantificar marcadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6 e IL-10) em diferentes regiões (pré-frontal, hipocampo e amígdala) do SNC, bem como em soro (24 horas, 10 e 30 dias após administração dos fármacos DEX e/ou IDA ;
- 3 - Determinar a ativação microglial através de imuno-histoquímica de IBA-1, em hipocampo em 24 horas, 10 e 30 dias após administração dos fármacos DEX e/ou IDA;
- 4 - Quantificar níveis de glutamato através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) 24 horas, 10 e 30 dias após administração dos fármacos DEX e/ou IDA;
- 5- Avaliar os níveis proteicos de BAX, Bcl-2 em 24 horas, 10 e 30 dias após administração dos fármacos DEX e/ou IDA;
- 6 - Avaliar os níveis proteicos de PSD-95 em 24 horas, 10 e 30 dias após administração dos fármacos DEX e/ou IDA;
- 7- Avaliar o comportamento (habituação a campo aberto, reconhecimento de novos objetos e esquiva inibitória) 10 e 30 dias após administração dos fármacos DEX e/ou IDA;

8- Acompanhar a mortalidade dos animais durante 10 dias após administração dos fármacos DEX e/ou IDA.

9- Avaliar comportamento e ativação microglial dos animais tratados tardiamente, logo após o fim dos tratamentos e 30 dias após sepse;

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

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 os números de protocolos de aprovação: 031/2018-1 e 23/2020. Todo o projeto foi executado dentro das normas estabelecidas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) para pesquisas utilizando animais. O estudo foi dividido em duas etapas, uma com administração do fármaco concomitante á indução de sepse e outra 15 dias após indução de sepse. O número de animais em cada grupo foi baseado em estudos pré-clínicos, para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados, com uma variância de no máximo 10% entre as médias calculou-se um tamanho de amostra, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%. Foram utilizados ratos Wistar machos com 60 dias, fornecidos pelo Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais ficaram acondicionados em caixas com 5 animais cada, sob ciclo de claro e escuro de 12 horas (6:00 às 18:00h), com livre acesso à comida e água e exaustão diária constante. O ambiente foi mantido à temperatura constante e diária de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. As caixas dos animais foram trocadas diariamente, bem como alimentação e água, de modo a mantê-los com o máximo possível de conforto.

4.2 INDUÇÃO DE SEPSE E TRATAMENTOS

A indução de sepse foi realizada pelo modelo de perfuração e ligação cecal (CLP), que segundo Brooks et al. (2007) este é o modelo que mais se assemelha ao quadro de sepse em humanos. Os ratos foram previamente anestesiados via intraperitoneal com 80mg/kg de cetamina e 10mg/kg de xilazina posteriormente foi realizado uma laparotomia de aproximadamente 2 cm no abdome do rato; exposição do intestino; ligação do ceco abaixo da válvula ileocecal, para obstrução do trânsito do conteúdo intestinal. Foi realizada uma perfuração cecal, objetivando o extravasamento das fezes para a cavidade peritoneal, liberando a flora bacteriana e gerando uma resposta imune exacerbada induzida por infecção polimicrobiana. Após a indução de sepse foi realizada reposição volêmica (50mL/kg de salina) e a administração de antibiótico ceftriaxona (30mg/kg), que segundo Hollenberg et al. (2001)

previne o aparecimento de abscesso pericecal, diminuindo a gravidade da sepse e assim diminuindo a mortalidade dos animais, facilitando a realização de estudos a longo prazo.

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi dividido em duas etapas: Para a primeira etapa os fármacos foram administrados nos três dias seguintes a indução da sepse (Figura 9) e para a segunda etapa, os fármacos foram administrados somente 15 dias após sepse (Figura 10). Em ambas as etapas os animais foram divididos em 5 grupos: Sham + Salina (SAL), CLP+SAL, CLP+DEX, CLP+IDA, CLP+IDA+DEX. Nestes animais DEX (50 µg/kg) e/ou IDA (1mg/kg) foram administrados logo após a indução da sepse (primeira etapa) e 15 dias após (segunda etapa), via subcutânea em um volume máximo de 1mL/Kg em dose única diária durante três dias. Quando os fármacos foram administrados em conjunto, o IDA foi injetado 30 minutos antes da DEX para garantir competição farmacológica ao nível do receptor (objetivo do uso do antagonista, determinar se o efeito da DEX é unicamente devido ao agonismo α -2). Os animais foram eutanasiados 24 horas, 10 e 30 dias após a administração dos fármacos para retirada de estruturas cerebrais: hipocampo, pré-frontal e amígdala para realizar teste de Elisa para quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10, expressão de receptores α -2 adrenérgicos por PCR, imunohistoquímica de IBA-1 para quantificação da ativação microglial, quantificação de BAX, BCL2 e PSD-95 por *Western Blott* e quantificação de glutamato por HPLC. Foram realizados também testes comportamentais antes da eutanásia dos animais em 10 e 30 dias. Os testes foram: habituação ao campo aberto, reconhecimento de novos objetos e esQUIVA inibitória.

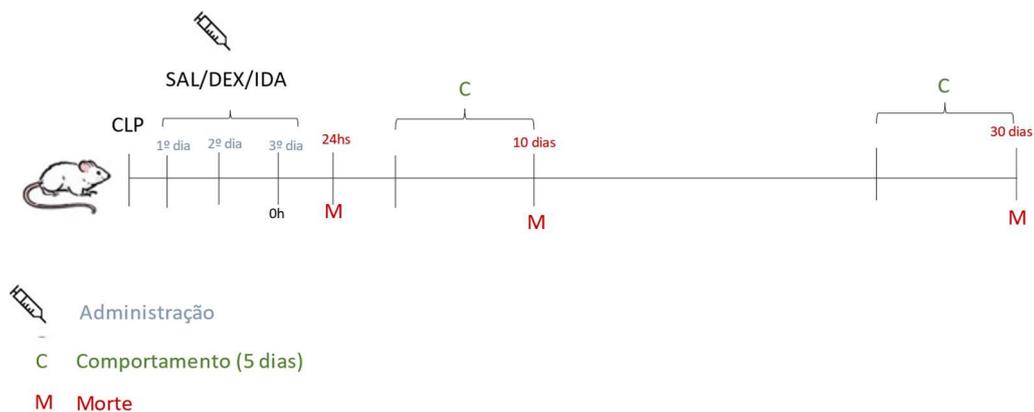


Figura 9: Linha do tempo da primeira etapa do experimento, com administração dos fármacos logo após sepse. Contendo data de indução da sepse, administrações, comportamentos e morte. Fonte: Autora (2020).

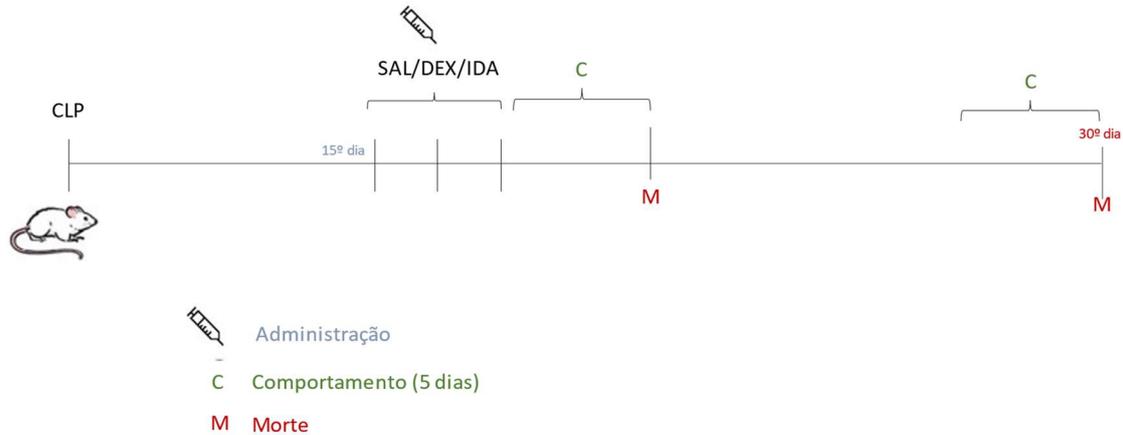


Figura 10: Linha do tempo da segunda etapa do experimento, com administração dos fármacos 15 dias após sepse. Contendo data de indução da sepse, administrações, comportamentos e morte. Fonte: Autora (2020).

4.4 NÍVEIS DE CITOCINAS

A quantificação de citocinas IL-1 β , IL-6 e IL10 no hipocampo, pré-frontal, amígdala e soro foram determinadas através do kit comercial de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). O anticorpo de captura (IL-1 β , IL-6 e IL10) foi adicionado na placa e encubado durante 15 horas. Após a incubação as placas foram lavadas com tampão de lavagem. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato salina (PBS). Foi adicionado primeiramente o diluente (100ul/poço) durante 1 hora, logo após as placas foram lavadas com tampão de lavagem novamente e posteriormente a amostra, padrão ou controle (100ul/poço) foram acrescentados e novamente incubados por 2h a temperatura ambiente. Depois de lavadas, foi adicionado o anticorpo de detecção, que ficou incubando durante 2h. Após incubação, as placas foram lavadas e adicionado streptavidina diluída em diluente, durante 20 minutos sem presença de luz. As placas foram novamente lavadas e foi acrescentado o substrato fotoreagente (TMB + H₂O₂) durante 20 minutos sem presença de luz. Foi adicionado a solução stop para parar a reação. A densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 450-570nm.

4.5 ATIVAÇÃO MICROGLIAL

Para verificar a ativação microglial foi realizada a técnica de imunohistoquímica. Amostras de cérebro emblocadas em parafina foram cortadas a 5µm e incubadas em peróxido de hidrogénio (0,5%) durante 15 minutos à temperatura ambiente para bloquear a atividade da peroxidase. Após lavagem com TBS, as lâminas foram incubadas com Ultra V Block a fim de reduzir a coloração de fundo (*background*) não específica. As lâminas foram então incubadas individualmente com anticorpo IgG monoclonal de coelho anti-IBA-1 (diluição 1:1000) (Abcam, Cambridge, MA). Após, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário Anti-IgG de coelho biotinizada (diluição 1:100, Abcam). E então incubadas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Spring Bioscience) e foi realizada a coloração do tecido através da Hematoxilina de Harris e montagem das lâminas para posterior leitura. Foram obtidas imagens por corte cerebral a uma ampliação de ×100 e a área imunopositiva foi expressa como percentagem da área total analisada. Foi utilizado controle positivo em todos os grupos, de acordo com o *datasheet* do anticorpo.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTT

Os níveis proteicos de BAX, BCL2 e PSD-95 foram mensurados por *Western blotting* utilizando anticorpo específico. Para executá-lo as amostras foram homogeneizadas em tampão Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% (w/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), 10% (v/v) de glicerol e quantidades iguais de proteína (100 µg/poço) foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. A eficiência da eletrotransferência foi verificada por meio de coloração Ponceau S, e a membrana foi bloqueada em Tampão Tween-Tris salina (TTBS: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 contendo 0,9% de NaCl e 0,1% de Tween 20) com 5% de albumina. As membranas foram incubadas overnight a 4°C com os anticorpos primários. Anticorpo secundário Anti-IgG de coelho foi incubado com as membranas durante 2 horas (1:1000), a membrana foi lavada novamente com TTBS e a imunorreatividade foi detectada por quimioluminescência amplificada utilizando ECL. A análise densitométrica dos filmes foi realizada com o software Image J® v.1.34. Todos os resultados foram expressos como uma razão relativa entre BAX, BCL2, PSD-95 e o imunoc conteúdo de proteína GAPDH.

4.7 PCR

4.7.1 Extração de RNA total

As amostras foram homogeneizadas em reagente comercial a base de etanol e tiocianato de guanidina (TRIzol - Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante (200 mg tecido/1 ml de Trizol). Após foram adicionados 200 μ l de clorofórmio para cada ml de homogenato e centrifugado 12.000 rpm por 15min a 4°C. A fase aquosa foi separada e adicionado 500 μ l de álcool isopropílico em cada amostra que foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. O pellet foi lavado e lavado com etanol 75% e centrifugado a 7500 rpm por 5 min a 4°C.

4.7.2 Determinação da pureza de RNA

Ao final da extração, 1 μ l de amostra foi ressuspensa em 199 μ l de água livre de RNase. Para a determinação da concentração e pureza do RNA foi utilizado espectrofotômetro Spectramax a partir das razões 280/260 nm. Esse valor deve apresentar-se acima de 1,8 para ser aceitável.

4.7.3 Síntese do cDNA

O cDNA foi preparado a partir do RNA total, utilizando 1 μ g de RNA de cada amostra. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit Protoscript II ST STRAND CDNA syn (Uniscience cód: E65650S) a partir de 6 μ l de amostra na concentração de 1 μ , acrescido de dNTP (50 μ M) e oligo-(dT)15 (1 μ M).

4.7.4 Desenho dos primers

Os primers específicos que foram utilizados neste estudo foram retirados de artigos referência (Agrawal et al., 2019; Huang et al., 2002; Ikeda et al., 2015) e conferidos no programa BLAST. Os genes utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Primers utilizados neste estudo

Receptor α2A-adrenérgico	Fw: 5'AGCTCGCTGAACCCTGTTAT3' Rv: 3'CTGACCAGGGTCTGTAAGCA5'
Receptor α2C-adrenérgico	Fw: 5'TGGCAGCCGTGGTGGGTTTCCTC3' Rv: 3'TCGGGCCGGCGGTAGAAAGAGAC5'
GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)	Fw: 5'AATGGGGTGATGCTGGTGCTGA3' Rv: 3'TGGGGGCTGAGTTGGGATGG5'

Fonte: Autora, 2019.

4.7.5 Reações de qPCR

Todas as reações de qPCR foram realizadas utilizando o kit SYBR gene PCR Master Mix (Invitrogen). As reações de 20 μ l contém 10 μ l de SYBR Green qPCR Mix 1X, que possui o fluoróforo SYBR Green I, Taq polimerase, dNTPs, MgCl₂ e o tampão da enzima, e os 10 μ l restantes foram adaptados entre amostra e primers. Os ensaios foram realizados no termociclador *Life 7500 Fast*. Os programas de ciclagem de cada gene incluem ativação da enzima no Holding Stage a 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, em seguida 40 ciclos de 15s de desnaturação a 95°C e 1 min de anelamento com a temperatura de 60°C, ao final na curva de dissociação (*Melt Curve Stage*) os ciclos foram de 95°C por 15s, 60°C por 1 min e 95°C por 15s para analisar o perfil dos produtos formados. O programa disponível pela *Life technologies* transforma os valores brutos de fluorescência em uma escala logarítmica, e assim o limiar foi delimitado baseando-se no coeficiente de correlação (R²) e na eficiência da curva, calculada pelo próprio aparelho.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTAMATO POR HPLC

O conteúdo de glutamato no cérebro de ratos foi estimado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; De Benedetto et al., 2014; Perucho et al., 2015). Na análise do glutamato, o padrão e as amostras foram derivatizados antes da coluna com solução reagente de 2-O-ftialaldeído (OPA). O reagente de derivatização foi: 32 mg de OPA diluído em 800 μ l de metanol, 7.140 μ l de tampão borato 0,4 M (pH 9,5) e 60 μ l de ácido 3-mercaptopropiônico (Sigma-Aldrich), preparado a cada semana e protegido da exposição à luz. A reação de derivatização foi realizada com um injetor automático programável. Foram adicionados 10 ml de reagente OPA a 20 μ l de padrão ou amostra. Após 1 min de reação, para interrompê-lo, foram adicionados 5 μ l de ácido acético a 5%. 32 μ l da mistura de reação foram injetados no sistema analítico. Para evitar a injeção de bolhas, foram utilizados 12 μ l da mistura como volume de descarga e 20 μ l para preencher completamente o circuito calibrado, permanecendo 3 μ l no tubo de mistura. A precisão do método de injeção foi medida como um coeficiente de variação da área para dez injeções, resultando em um CV <0,5%. As amostras foram armazenadas a -80 ° C até a análise. Após homogeneização em 400 μ l de ácido perclórico 0,2 M contendo cisteína 3 mM, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para análise por HPLC seguida de detecção fluorimétrica. O sistema compreende uma coluna de cromatografia Ascentis® C18 (250 mm \times 2,1 mm, 5 μ m; Supelco®, cidade do Texas, EUA), uma bomba LC-20AT acoplada a um amostrador automático SIL-20AHT e um detector de fluorescência RF-20A e LC Software de solução (Shimadzu, Kyoto, Japão). A temperatura da coluna ficou a 35 ° C e foi utilizada uma taxa de fluxo de 0,3 mL / min. A fase móvel consiste em tampão acetato (pH 3,5, ácido acético 12 mM, EDTA 0,26 mM) e metanol (86:14, v / v). A fluorescência foi monitorada nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 279 e 320 nm, respectivamente. Os picos foram identificados comparando seu tempo de retenção na solução da amostra (extrato de tecido) com o da solução padrão. As amostras foram injetadas um volume de 20 μ L. Os resultados foram expressos em ng / mg de proteína.

4.9 TESTES COMPORTAMENTAIS

O aprendizado e a memória foram avaliados em tarefa de esQUIVA inibitória, reconhecimento de novos objetos e habituação ao campo aberto 10 e 30 dias após a última aplicação dos fármacos. O procedimento de teste comportamental foi conduzido em sala isolada

de som. Todos os testes foram realizados por pessoas que desconheciam o experimento e/ou grupo experimental.

4.9.1 Habituação à campo aberto

O teste de habituação ao campo aberto foi realizado em uma caixa retangular com dimensões de 40 X 60 cm rodeado por paredes de 50 cm de altura sendo 3 paredes de madeira e uma de vidro transparente (Figura 11). O piso do campo aberto foi dividido em 9 retângulos iguais por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante traseiro esquerdo e deixados a explorar o campo por 5 min (sessão de treino). Em seguida, os animais foram levados de volta para a sua gaiola, e 24h após foram novamente submetidos a uma sessão de campo aberto semelhante (sessão de teste). O cruzamento das linhas pretas (*crossing*) e levantamentos (*rearing*) realizados em ambas as sessões foram contados. A diminuição do número de cruzamentos e levantamentos entre as duas sessões foram tomados como uma medida da retenção de habituação (Roesler et al., 2003).

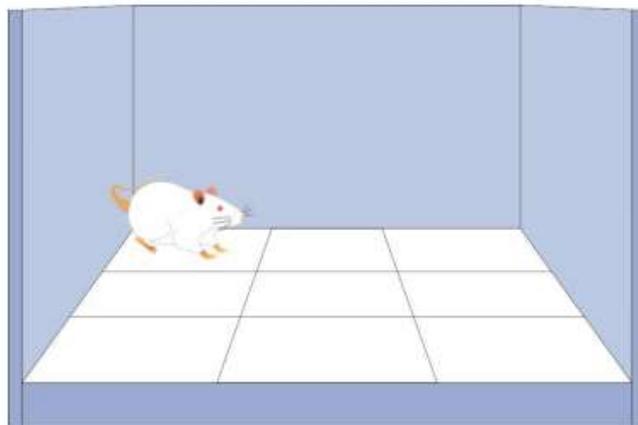


Figura 11: Habituação à campo aberto. Fonte: Generoso (2017).

4.9.2 Reconhecimento de novos objetos

A tarefa de reconhecimento de novos objetos é um teste comportamental utilizado para avaliar memória de longo prazo. Os ratos foram submetidos à uma sessão de habituação,

em um campo aberto com dimensões de $45 \times 40 \times 60$ cm (Figura 12) sem objetos. Após 24h foi realizada a sessão de treino por 5 min onde foram expostos a dois objetos idênticos na arena de treinamento). Foi cronometrado o tempo gasto explorando os objetos. Na sessão de teste, realizada 24 horas após o treino, um dos objetos foi trocado por outro diferente em forma, tamanho e cor (De Lima et al., 2007). A premissa do teste é que os ratos devem passar mais tempo explorando o objeto novo, que é desconhecido do que o objeto familiar. 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.

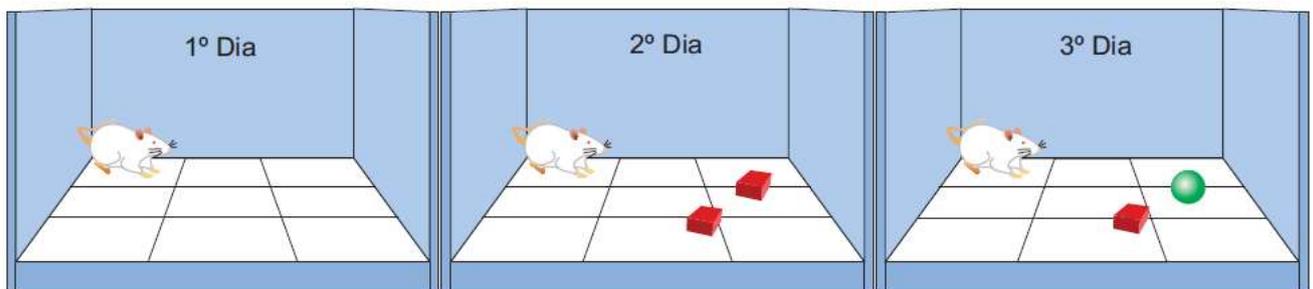


Figura 12: Reconhecimento de novos objetos. Fonte: Collodel (2017).

4.9.3 Esquiva inibitória

Baseia-se em uma caixa acrílica com um piso formado por uma grade de barras de metal, onde estas são conectadas a uma fonte de corrente elétrica em mA, junto a esta grade encontra-se uma plataforma. No treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e foi medido o tempo gasto para descer (tempo de latência), colocando todas as patas para fora da mesma (Izquierdo et al., 1998) (Figura 13). Após a descida, os animais receberam um estímulo elétrico de 0,4mA durante dois segundos. Passadas 24 horas da sessão treino, ocorreu a sessão teste, onde os animais foram colocados sobre a plataforma novamente e foi avaliado quanto tempo levaram para descer (no máximo 180s), nesta etapa os animais não receberam estímulo elétrico. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória aversiva de longa duração (Roesler et al., 1999).

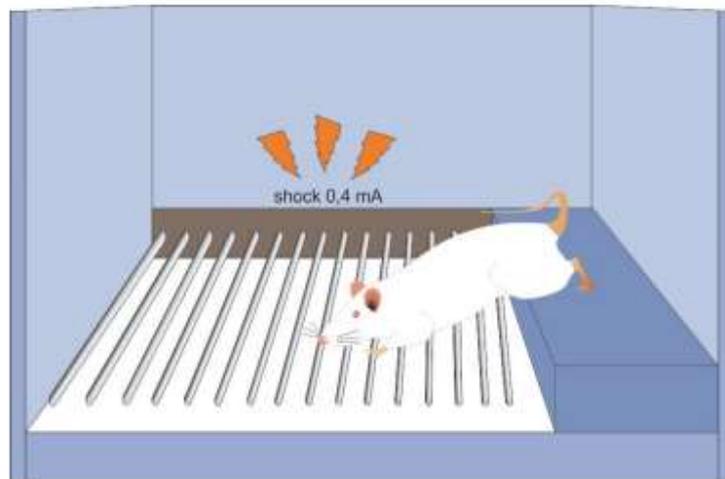


Figura 13: EsQUIVA inibitória. Fonte: Generoso (2017).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas foram apresentadas na forma de média \pm desvio padrão ou de mediana (intervalo interquartil) e comparadas com o teste t-Student ou análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey quando necessário. As diferenças entre treino e teste foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon. As análises de PCR foram realizadas pelo Software *Expression Suite* versão 1.0.3 com relação do alvo/GAPDH. A técnica de Western Blott e imunohistoquímica foram quantificados pelo software ImageJ ®. A comparação das curvas de sobrevivência foi realizada por meio da aplicação da análise de sobrevivência pelo teste de Kaplan Meier, seguido de log-rank. Todos os testes foram analisados no programa SPSS versão 21 e/ou GraphPad Prism 4.0. Em todas as análises foi adotado como nível para significância estatística um p valor $< 0,05$.

5 RESULTADOS

ETAPA I – TRATAMENTO LOGO APÓS INDUÇÃO DE SEPSE

5.1 EXPRESSÃO DE RECEPTORES α -2_A e α -2_C ADRENÉRGICOS POR PCR EM 24HS, 10 E 30 DIAS PÓS TRATAMENTO

Após avaliar a expressão de receptores α -2_A adrenérgicos em diferentes grupos e tempos, foi observado que em 24hs a expressão dos receptores não apresentou diferença estatística entre os grupos. Já em 10 dias, os grupos que receberam algum tipo de tratamento (CLP+DEX, CLP+IDA e CLP+IDA+DEX), apresentaram uma diminuição na expressão destes receptores em relação aos grupos Sham e CLP (figura 14) em pré-frontal, amígdala e hipocampo, sendo que nesta última estrutura, o grupo CLP também apresentou uma diminuição na expressão em relação ao grupo Sham. Em 30 dias após tratamentos, não houve diferença estatística entre os grupos em pré-frontal e hipocampo, já na amígdala o grupo CLP+IDA, demonstrou diminuição na expressão deste receptor em relação a Sham, CLP e CLP + DEX.

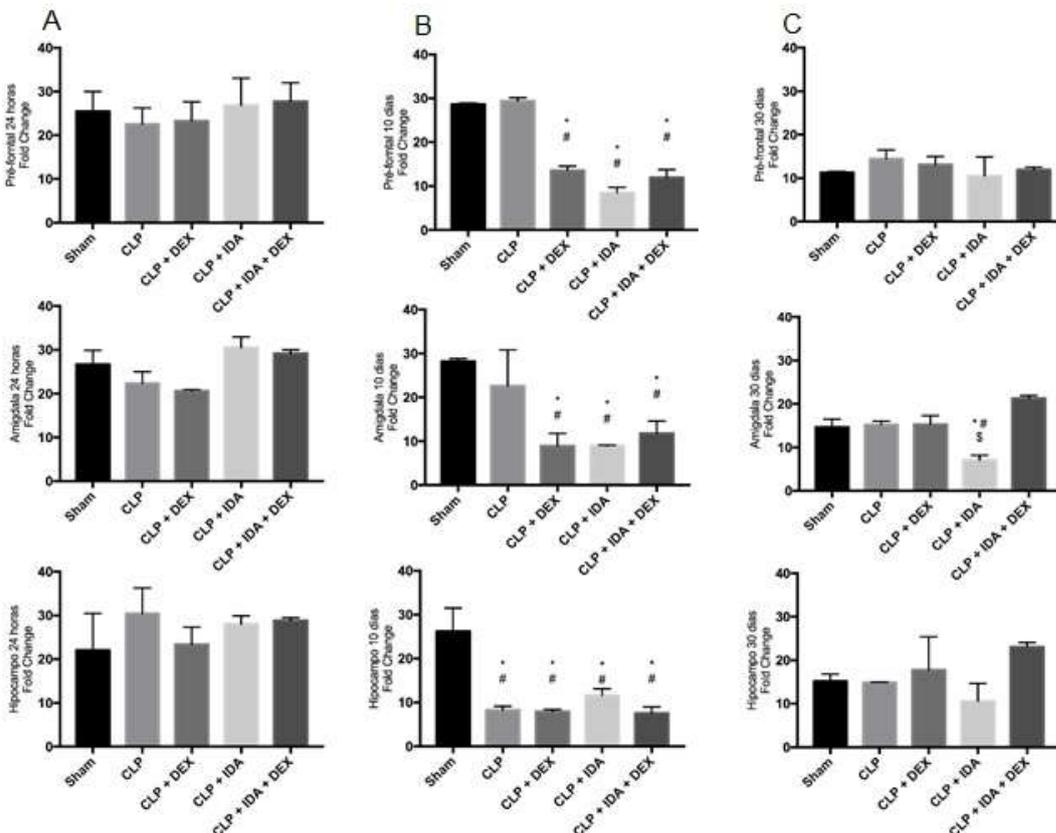


Figura 14: Expressão do receptor α 2a- adrenérgico em diferentes grupos e estruturas cerebrais, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. (A) 24hs após tratamento; (B) 10 dias após; (C) 30 dias após. *diferente de Sham; # diferente de CLP; \$ diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média \pm DP. $p < 0,05$.

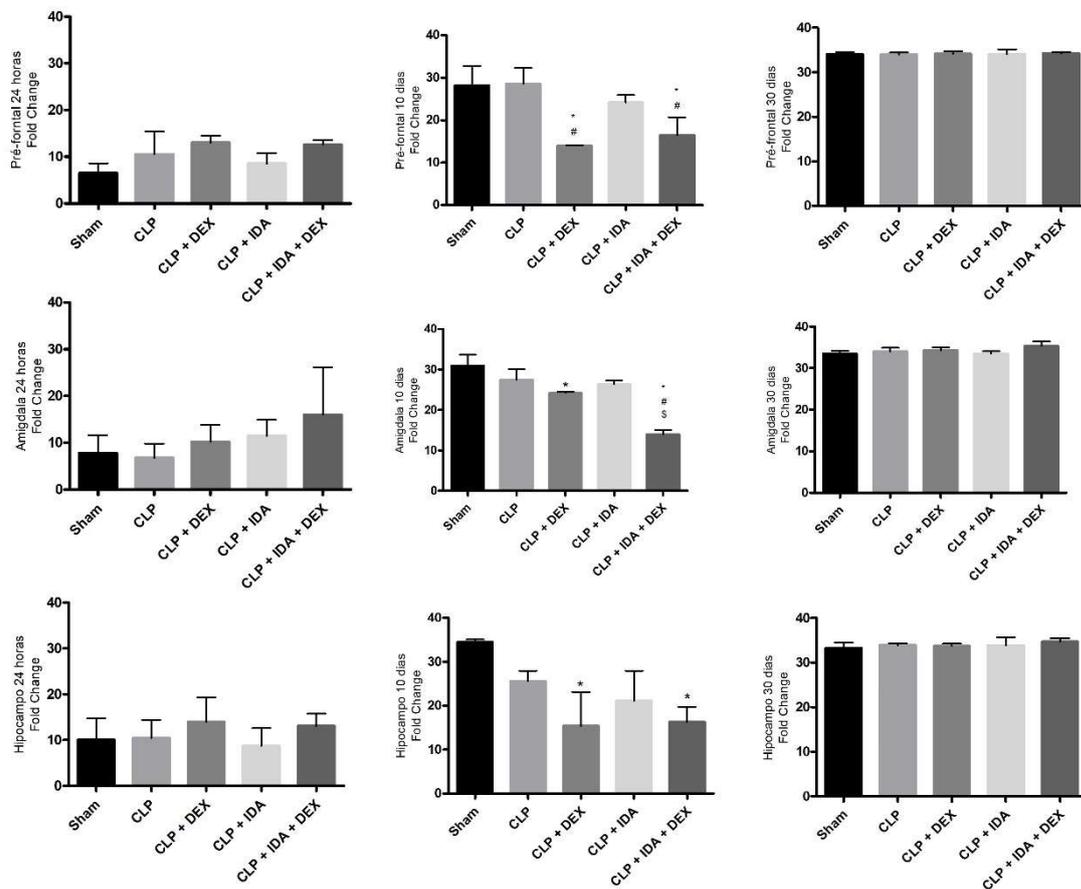


Figura 15: Expressão do receptor α_2c -adrenérgico em diferentes grupos e estruturas cerebrais, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. (A) 24hs após tratamento; (B) 10 dias após; (C) 30 dias após. *diferente de Sham; # diferente de CLP; \$ diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média \pm DP. $p < 0,05$.

A expressão dos receptores α_2c -adrenérgicos (Figura 15) não apresentou diferenças estatísticas entre grupos em 24 horas e 30 dias, assim como a dos receptores α_2A , em nenhuma das estruturas. Já em 10 dias, os grupos que receberam DEX (CLP+ DEX; CLP+IDA+DEX) apresentaram uma diminuição na expressão destes receptores, em relação a Sham em todas as estruturas avaliadas. Em pré-frontal, houve também a diminuição da expressão destes grupos em relação ao grupo CLP. Já na amígdala, o grupo CLP+IDA+DEX apresentou ainda uma diminuição em relação a CLP e ao grupo CLP+DEX.

5.2 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO CEREBRAL E SISTÊMICA

Para observar os efeitos da administração de DEX e/ou IDA, em relação a inflamação sistêmica e cerebral foram dosadas citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1 β e a citocina anti-

inflamatória IL-10 em 24 horas, 10 e 30 dias após tratamentos. Com relação aos níveis séricos, em 24 horas, os níveis de IL-6 (Figura 16) e IL-1 β (Figura 17) estavam aumentados no grupo CLP em relação a Sham, e diminuídas nos grupos CLP+DEX e CLP+IDA na citocina IL-6 e no grupo CLP+IDA+DEX na citocina IL-1 β . Já na citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 18), pode-se observar uma diminuição desta citocina nos grupos tratados com IDA quando comparado ao grupo tratado apenas com DEX. Já em 10 dias, apenas as citocinas IL-1 β e IL-10 apresentaram resultados significativos. A citocina IL-1 β manteve-se elevada no grupo CLP em relação a Sham, e o grupo IDA+DEX diminuído em relação a CLP. Porém o grupo DEX estava diminuído em relação a CLP e o grupo tratado com IDA+DEX apresentou níveis de IL-1 β diminuídos em relação ao grupo que só recebeu IDA. A citocina anti-inflamatória IL-10 apresentou níveis diminuídos no grupo tratado com os dois fármacos concomitantes (IDA+DEX) quando comparado ao grupo que só recebeu DEX. 30 dias após os tratamentos, os níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-10 já se apresentaram normalizados, não demonstrando diferenças estatísticas entre os grupos.

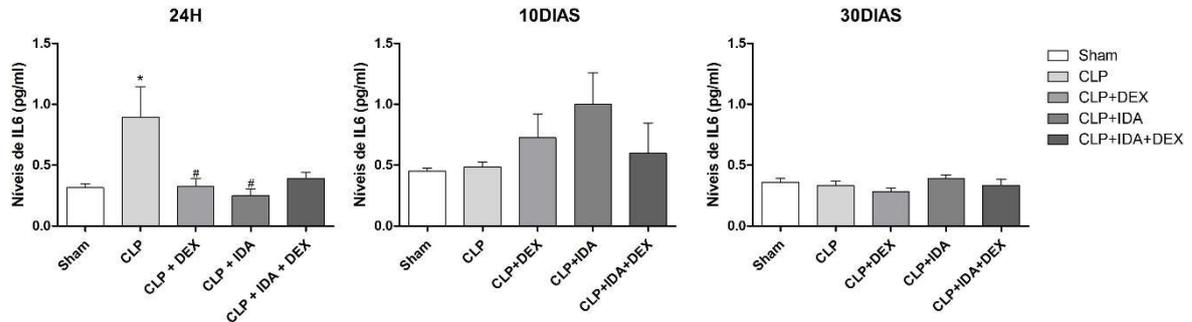


Figura 16: Níveis séricos da citocina IL-6 em diferentes grupos, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. *diferente de Sham; # diferente de CLP; & diferente de CLP+IDA. Dados foram expressos como média \pm EPM. $p < 0,05$.

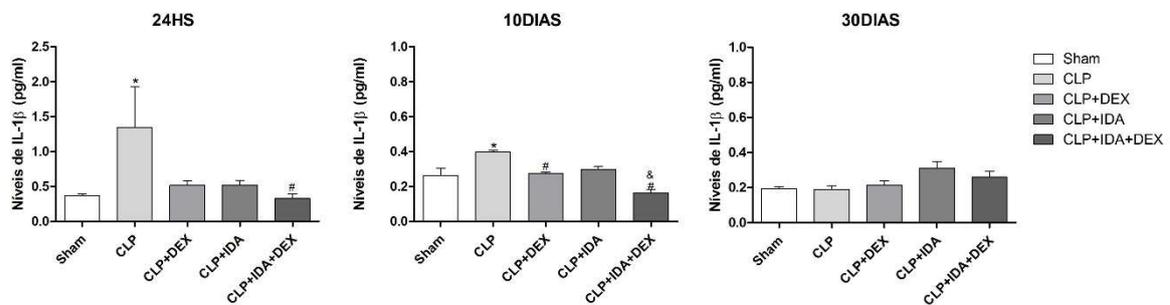


Figura 17: Níveis séricos da citocina IL-1 β em diferentes grupos, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. *diferente de Sham; # diferente de CLP; & diferente de CLP+ IDA. Dados foram expressos como média \pm EPM. $p < 0,05$.

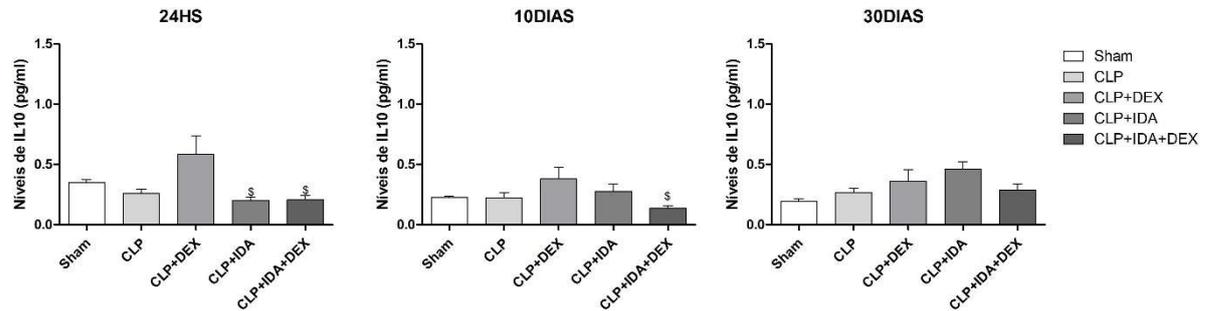


Figura 18: Níveis séricos da citocina IL-10 em diferentes grupos, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. § diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média±EPM. $p < 0,05$.

Quanto à inflamação cerebral, foi mensurado níveis de IL-6, IL-1 β e IL-10 em pré-frontal, amígdala e hipocampo em 24hs, 10 e 30 dias em animais submetidos a sepse e tratados com DEX e/ou IDA. Pode-se observar que os níveis de IL-6 em pré-frontal (Figura 19) estavam aumentados no grupo séptico sem tratamento e no grupo tratado com ambos os fármacos utilizados concomitantemente (CLP+IDA+DEX) em relação a Sham, sendo ainda que o grupo IDA+DEX apresentou-se elevado quando comparado com o grupo que recebeu apenas DEX, demonstrando que IDA foi capaz de bloquear os efeitos de DEX. Aos 10 dias após os tratamentos, apenas o grupo que recebeu IDA, apresentava-se com níveis de IL-6 aumentados em relação a Sham em pré-frontal. Aos 30 dias não houve diferença estatisticamente significativa em pré-frontal. Não houve diferença estatística na amígdala (Figura 20) quando se refere a citocina IL-6 em nenhum dos tempos. Já em hipocampo (Figura 21), os níveis de IL-6 estavam aumentados no grupo CLP em relação a Sham e os grupos que receberam DEX estavam diminuídos quando comparados ao grupo CLP, tanto em 24 horas quanto em 30 dias.

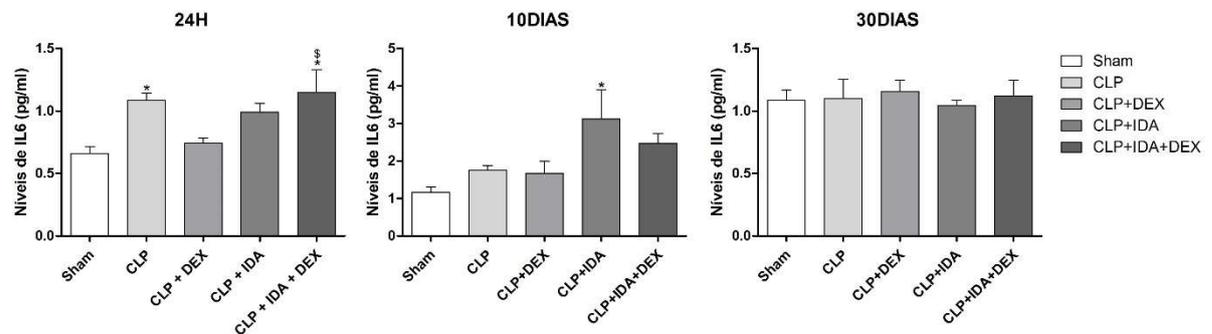


Figura 19: Níveis da citocina IL-6 em pré-frontal de diferentes grupos, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. *diferente de Sham; § diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média±EPM. $p < 0,05$.

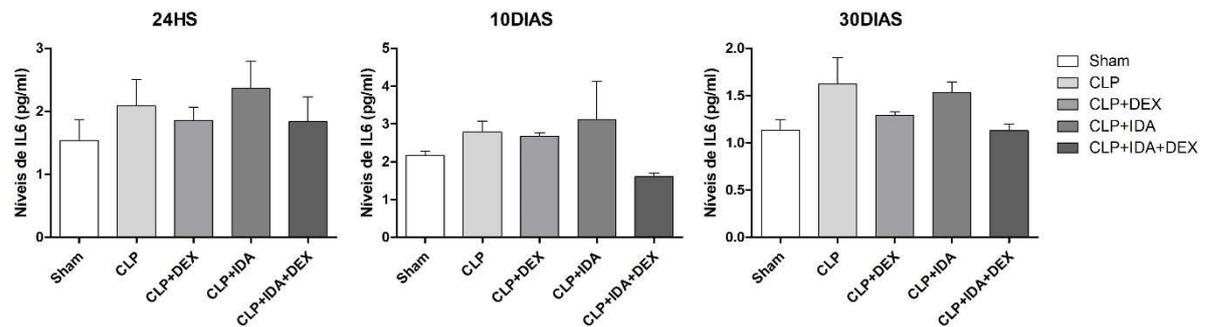


Figura 20: Níveis da citocina IL-6 em amígdala de diferentes grupos, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. Dados foram expressos como média±EPM. $P < 0,05$.

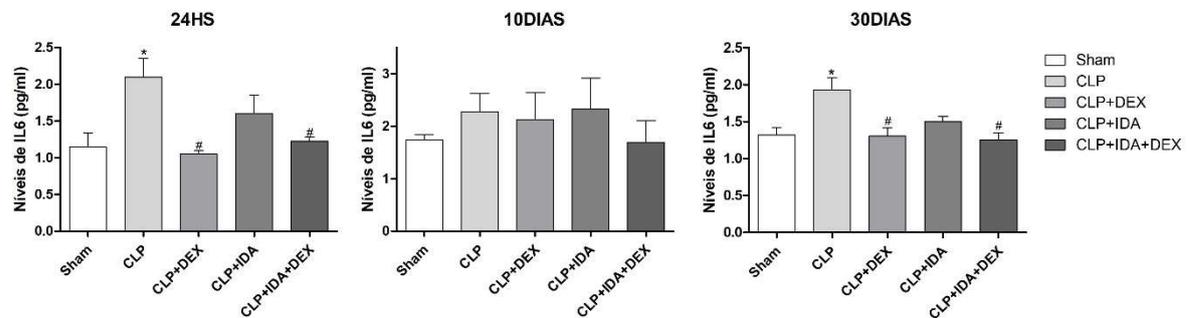


Figura 21: Níveis da citocina IL-6 em hipocampo de diferentes grupos, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. *diferente de Sham; # diferente de CLP. Dados foram expressos como média±EPM. $p < 0,05$.

Quando avaliado a citocina IL-1 β , em 24 hs, houve diferença estatística apenas em pré-frontal (Figura 22), onde os grupos sépticos sem tratamento ou tratados com IDA apresentaram níveis aumentados em relação a Sham. O grupo que recebeu DEX apresentou níveis diminuídos desta citocina em relação a CLP e CLP+IDA+DEX. Aos 10 dias, os grupos que receberam DEX (CLP+DEX; CLP+IDA+DEX) apresentaram níveis menores desta citocina, quando comparados ao grupo CLP sem tratamento em todas as estruturas. Em pré-frontal e amígdala (Figura 23) o grupo CLP estava aumentado em relação a Sham. E por fim, apenas em pré-frontal, o grupo IDA estava diminuído quando comparado a CLP. Quando avaliado esta citocina 30 dias após os tratamentos, apenas em pré-frontal o grupo IDA ainda mantinha níveis elevados em relação a Sham, não apresentando diferenças estatísticas aos 30 dias na amígdala e hipocampo (Figura 24).

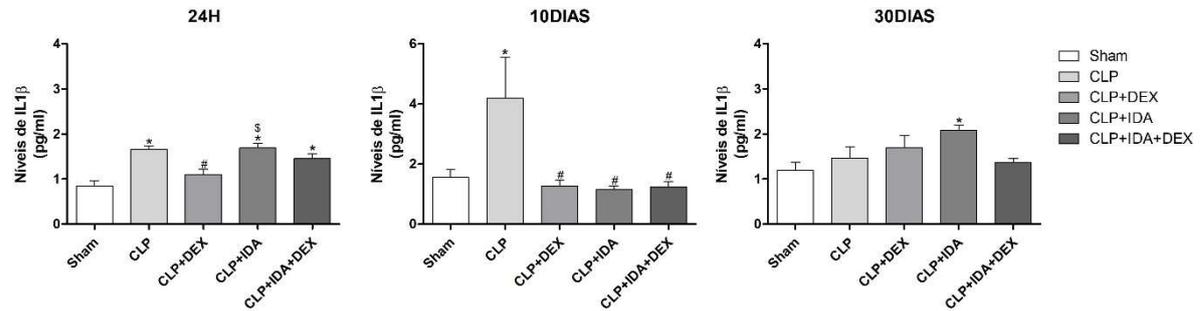


Figura 22: Níveis da citocina IL-1 β em pré-frontal de diferentes grupos, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. *diferente de Sham; # diferente de CLP; \$ diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média \pm EPM. $p < 0,05$.

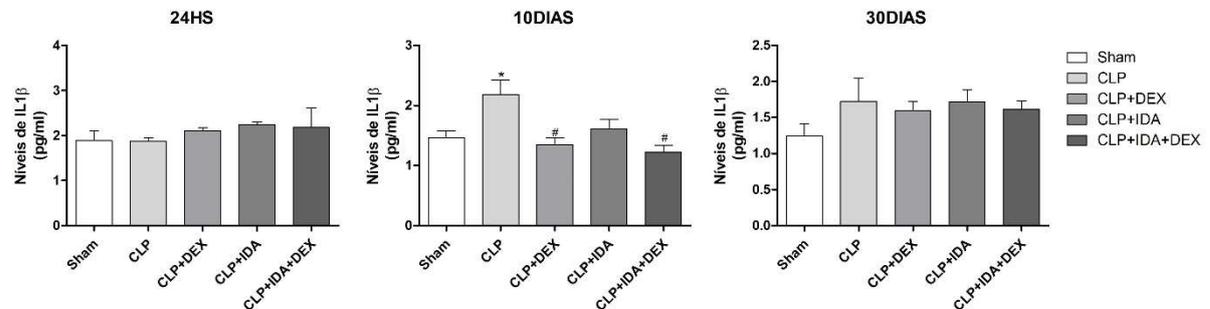


Figura 23: Níveis da citocina IL-1 β em amígdala de diferentes grupos, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. *diferente de Sham; # diferente de CLP. Dados foram expressos como média \pm EPM. $p < 0,05$.

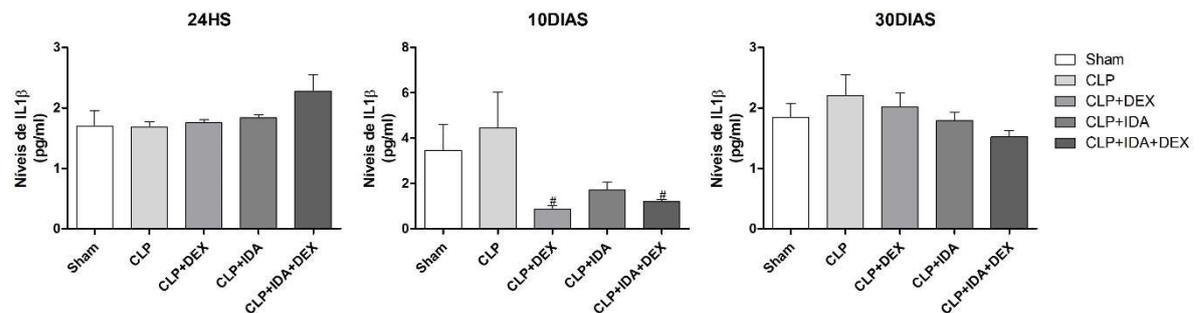


Figura 24: Níveis da citocina IL-1 β em hipocampo de diferentes grupos, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. # diferente de CLP. Dados foram expressos como média \pm EPM. $p < 0,05$.

A citocina anti-inflamatória IL-10, apresentou-se elevada em 24 horas no grupo que recebeu apenas DEX em relação a Sham, em todas as estruturas: pré-frontal (Figura 25), amígdala (Figura 26) e hipocampo (Figura 27). E ainda elevada também no grupo DEX quando comparado a CLP em pré-frontal e hipocampo. Não houve diferença significativa desta citocina em 10 e 30 dias em nenhuma das estruturas.

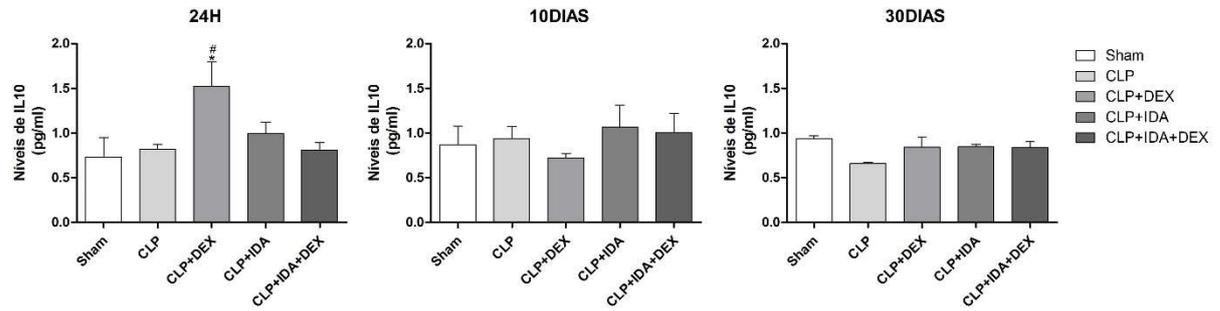


Figura 25: Níveis da citocina IL-10 em pré-frontal de diferentes grupos, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. *diferente de Sham; # diferente de CLP. Dados foram expressos como média±EPM. $p < 0,05$.

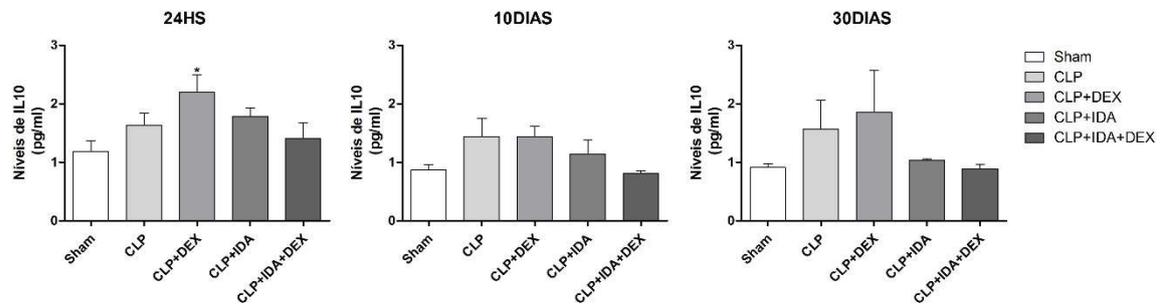


Figura 26: Níveis da citocina IL-10 em amígdala de diferentes grupos, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. *diferente de Sham. Dados foram expressos como média±EPM. $p < 0,05$.

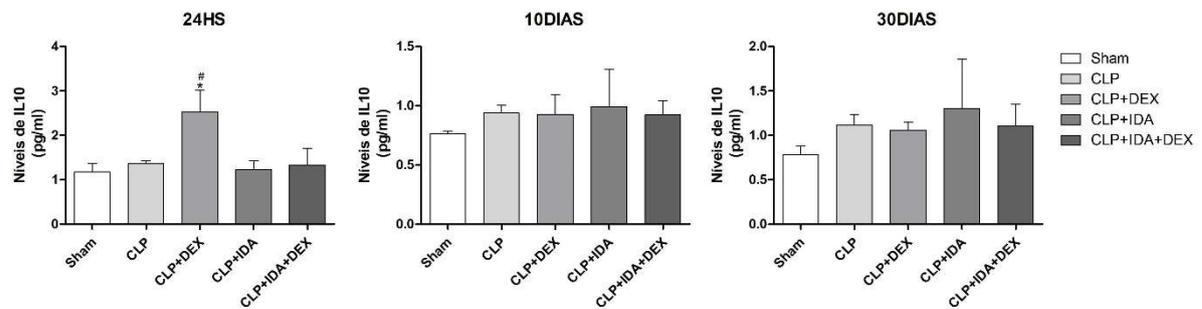


Figura 27: Níveis da citocina IL-10 em hipocampo de diferentes grupos, nos tempos de 24hs, 10 dias e 30 dias após tratamento. *diferente de Sham; # diferente de CLP. Dados foram expressos como média±EPM. $p < 0,05$.

5.3 ATIVAÇÃO MICROGLIAL

A fim de auxiliar na caracterização da inflamação cerebral, foi avaliado a ativação microglial, através da quantificação de células imunopositivas para IBA-1 em hipocampo (Figura 28). Os animais observados em 24 horas ainda não apresentavam uma diferença na ativação microglial entre os grupos, já em 10 dias, os grupos CLP e CLP+IDA+DEX apresentaram uma imunopositividade para IBA-1 elevada em relação a Sham, sendo que

quando tratado concomitantemente com IDA+DEX, a elevação da ativação microglial foi maior do que quando comparado com os grupos que receberam os fármacos isolados (CLP+DEX/CLP+IDA). Aos 30 dias, ambos os grupos que receberam IDA mantinham sustentada a elevação da ativação microglial em relação ao grupo séptico e tratado com DEX.

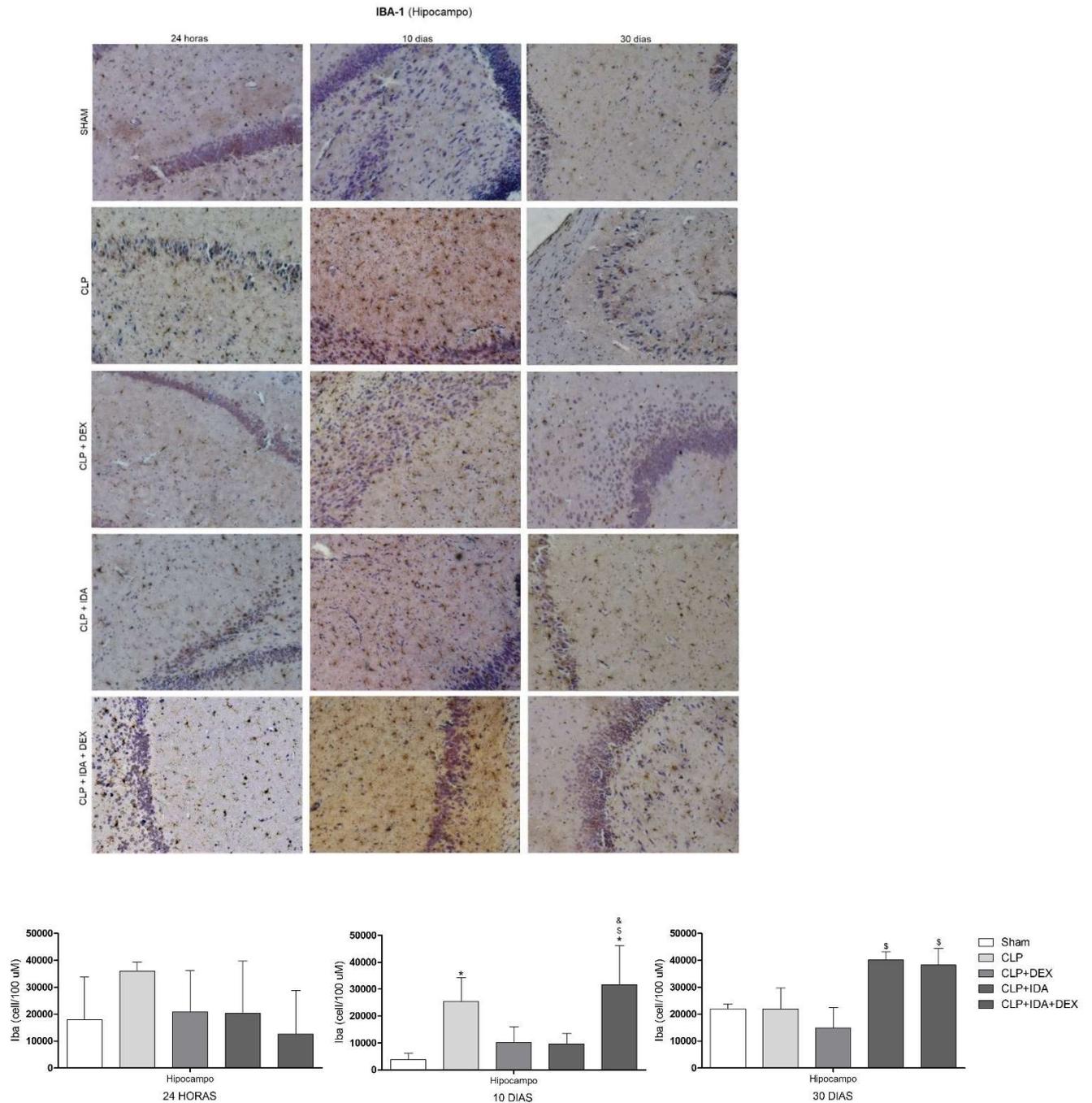


Figura 28: Determinação de células positivas para IBA-1, em hipocampo, por imuno-histoquímica. As células imunopositivas aparecem em marrom e foram expressas como porcentagem da área total analisada. n = 5 cada grupo.

Ampliação original 20X. As células imunopositivas foram quantificadas pelo software ImageJ. *diferente de Sham; & diferente de CLP+ IDA; \$ diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média±DP. $p < 0,05$.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTAMATO POR HPLC

Através da técnica de HPLC (*High-performance liquid chromatography*), foi quantificado níveis totais de glutamato em pré-frontal, amígdala e hipocampo em animais submetidos a sepse (CLP) ou sham-operados, e posteriormente tratados com DEX e/ou IDA, posteriormente foi realizado a eutanásia em 24 horas, 10 e 30 dias após o fim dos tratamentos. Em pré-frontal (Figura 29), 24 horas, os níveis de glutamato totais estavam aumentados no grupo CLP+DEX em relação a sham e CLP sem tratamento. E o grupo CLP+IDA+DEX apresentou níveis reduzidos em relação ao grupo CLP+DEX. Aos 10 dias não houve nenhuma diferença estatística, já em 30 dias, pode-se observar um comportamento oposto a 24hs, onde o grupo DEX apresentou níveis diminuídos de glutamato em relação a sham e CLP. E ambos os grupos que receberam IDA apresentaram níveis aumentados em relação ao grupo CLP+DEX.

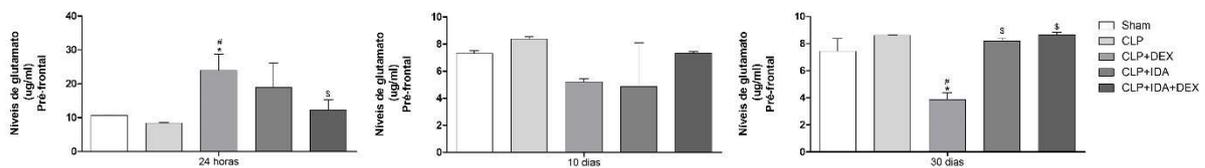


Figura 29. Quantificação de glutamato por HPLC em pré-frontal após indução de sepse e tratamentos. Os animais foram submetidos a CLP ou cirurgia simulada (Sham) e 24hs, 10 e 30 dias após a tratamentos os animais foram eutanasiados e o pré-frontal foi removido para a determinação dos níveis de glutamato. N = 4 cada grupo. A comparação entre grupos foi realizada através de ANOVA de uma via. *diferente de Sham; # diferente de CLP; \$ diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média±DP. $P < 0,05$.

Em relação aos níveis de glutamato na amígdala, o perfil apresentado foi semelhante aos resultados de pré-frontal, sendo que em 24 horas após tratamentos, o grupo CLP+DEX demonstrou níveis aumentados de glutamato total, em relação ao grupo CLP. Em 10 dias também não houve diferenças estatísticas entre os grupos. E em 30 dias, todos os grupos sépticos, tratados ou não, apresentaram níveis elevados de glutamato quando comparado a sham. O grupo CLP+DEX, estava diminuído em relação aos demais grupos CLP, tanto os grupos com os tratamentos ou sem.

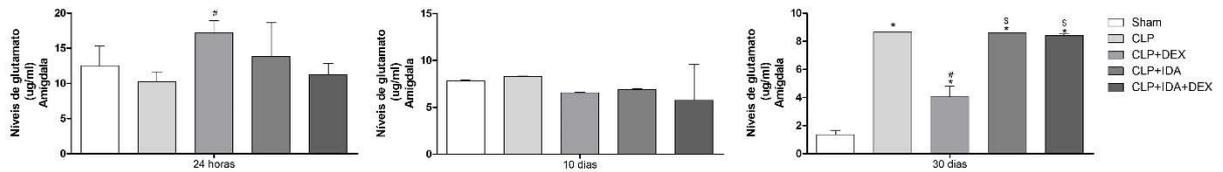


Figura 30. Quantificação de glutamato por HPLC em amígdala após indução de sepse e tratamentos. Os animais foram submetidos a CLP ou cirurgia simulada (Sham) e 24hs, 10 e 30 dias após a tratamentos os animais foram eutanasiados e a amígdala foi removido para a determinação dos níveis de glutamato. N = 4 cada grupo. A comparação entre grupos foi realizada através de ANOVA de uma via. *diferente de Sham; # diferente de CLP; \$ diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média±DP. P<0,05.

Em hipocampo, 24 horas após os tratamentos, novamente DEX apresentou níveis elevados de glutamato, quando comparado a CLP. O grupo CLP sem tratamento apresentou níveis diminuídos em relação a sham. O grupo CLP tratado apenas com IDA, apresentou-se elevado em relação a CLP. Já o grupo CLP+IDA+DEX, apresentou-se diminuído em relação a sham, CLP+DEX e CLP+IDA. Novamente os níveis de glutamato em 10 dias não apresentou diferenças estatísticas. E em 30 dias, todos os grupos sépticos tratados ou não, apresentaram níveis elevados de glutamato, quando comparados a sham, sendo que o grupo DEX, apresentou níveis diminuídos em relação aos demais grupos CLP.

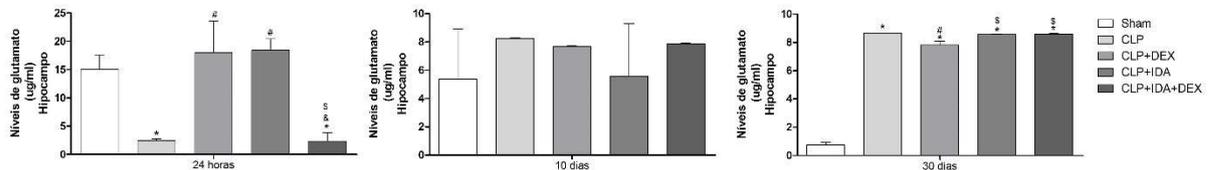


Figura 31. Quantificação de glutamato por HPLC em hipocampo após indução de sepse e tratamentos. Os animais foram submetidos a CLP ou cirurgia simulada (Sham) e 24hs, 10 e 30 dias após a tratamentos os animais foram eutanasiados e o hipocampo foi removido para a determinação dos níveis de glutamato. N = 4 cada grupo. A comparação entre grupos foi realizada através de ANOVA de uma via. *diferente de Sham; # diferente de CLP; & diferente de CLP+ IDA; \$ diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média±DP. P<0,05.

5.5 NÍVEIS PROTEICOS DE BAX, Bcl-2

Níveis das proteínas BAX/Bcl-2 foram mensurados em pré-frontal, amígdala e hipocampo em 24 horas, 10 e 30 dias após os tratamentos, a fim de investigar o papel da DEX no balanço entre estas proteínas pro e anti-apoptóticas, envolvidas na permeabilidade da membrana externa da mitocôndria. Os níveis de BAX, proteína pró-apoptótica, em 24 horas, demonstraram-se elevados nos animais sépticos, quando comparados aos do grupo controle, tanto em pré-frontal (Figura 32) quanto em amígdala (Figura 33). E após o tratamento com

DEX, esse nível foi diminuído ao comparar com CLP, sendo também menor que os grupos sépticos tratados apenas com IDA, ou IDA associado a DEX, tanto em amígdala quanto hipocampo (Figura 34). Tanto em amígdala e hipocampo, o grupo que recebeu IDA+ DEX, apresentaram níveis elevados de BAX em relação a Sham e CLP+DEX, demonstrando assim, que IDA agiu bloqueando os efeitos anti-apoptóticos da DEX. Em 10 dias após os tratamentos, apenas na amígdala o grupo CLP+IDA ainda apresentava níveis elevados de BAX quando comparado ao grupo CLP+DEX e esta diferença permaneceu até os 30 dias. Em hipocampo e pré-frontal não houve diferença significativa entre os grupos nem em 10 e nem em 30 dias.

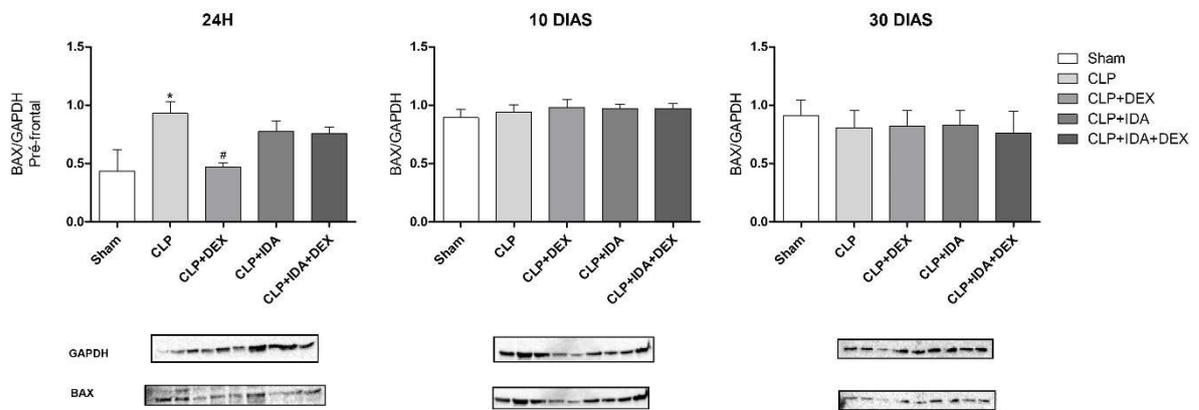


Figura 32. Níveis de BAX em pré-frontal após indução de sepse e tratamentos. Os animais foram submetidos a CLP ou cirurgia simulada (Sham) e 24hs, 10 e 30 dias após a tratamentos os animais foram eutanasiados e o pré-frontal foi removido para a determinação dos níveis de BAX. As imunotransferências representativas de amostras individuais de diferentes animais são mostradas. N = 4 cada grupo. As bandas foram quantificadas pelo software ImageJ. *diferente de Sham; # diferente de CLP. Dados foram expressos como média±DP. P<0,05.

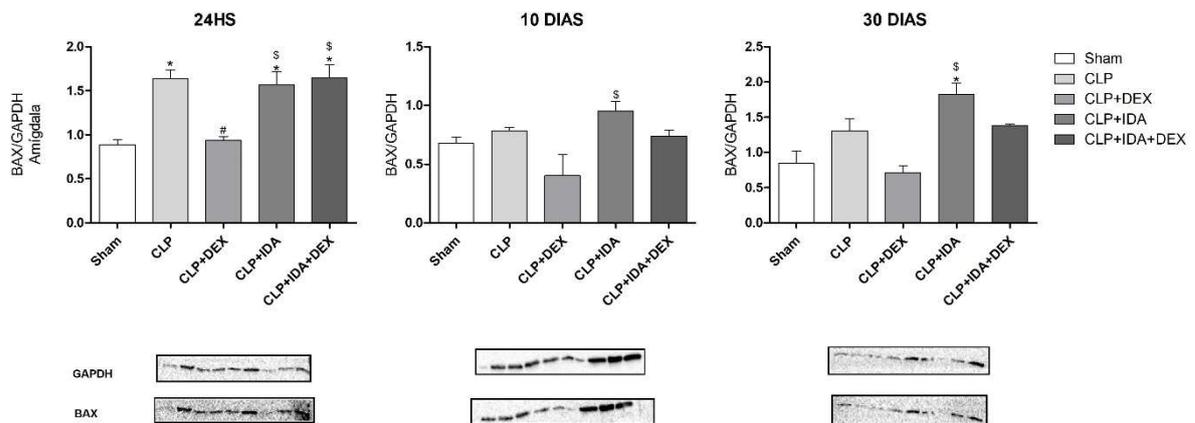


Figura 33. Níveis de BAX em amígdala após indução de sepse e tratamentos. Os animais foram submetidos a CLP ou cirurgia simulada (Sham) e 24hs, 10 e 30 dias após a tratamentos os animais foram eutanasiados e a amígdala foi removido para a determinação dos níveis de BAX. As imunotransferências representativas de amostras individuais de diferentes animais são mostradas. n = 4 cada grupo. As bandas foram quantificadas pelo software ImageJ. *diferente de Sham; # diferente de CLP; \$ diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média±DP. p<0,05.

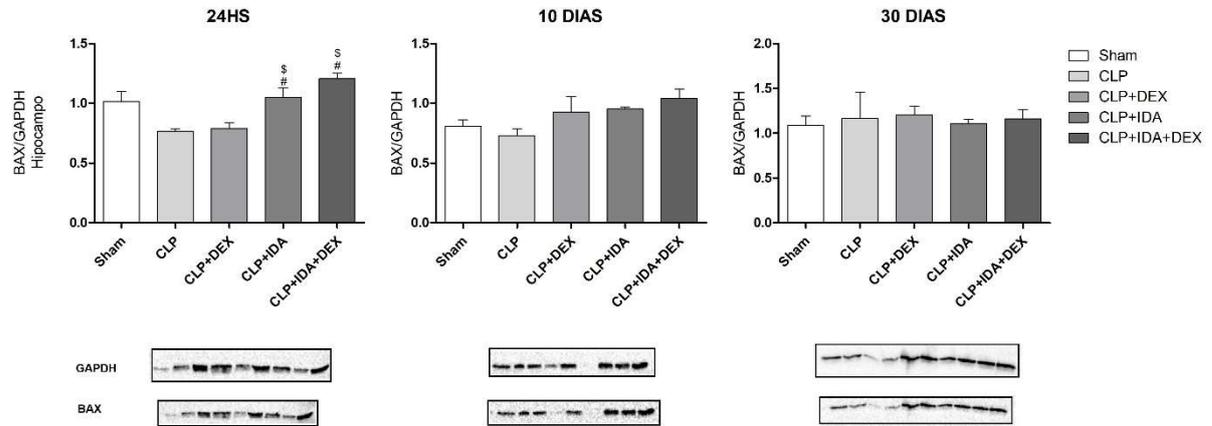


Figura 34. Níveis de BAX em hipocampo após indução de sepse e tratamentos. Os animais foram submetidos a CLP ou cirurgia simulada (Sham) e 24hs, 10 e 30 dias após a tratamentos os animais foram eutanasiados e o hipocampo foi removido para a determinação dos níveis de BAX. As imunotransferências representativas de amostras individuais de diferentes animais são mostradas. $n = 4$ cada grupo. As bandas foram quantificadas pelo software ImageJ. # diferente de CLP; \$ diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média \pm DP. $p < 0,05$.

A proteína Bcl-2, é capaz de se ligar a BAX, formando um complexo, impedindo assim a capacidade de BAX em desempenhar seu papel apoptótico, sendo assim, Bcl-2 apresenta características anti-apoptóticas. Níveis de Bcl-2, foram medidos nas mesmas estruturas e tempos. Em 24 horas, em pré-frontal (Figura 35) e hipocampo, os animais sépticos apresentaram níveis diminuídos de Bcl-2 em relação aos animais do grupo controle e em amígdala e pré-frontal, o grupo séptico que recebeu DEX, conseguiu aumentar os níveis desta proteína anti-apoptótica, quando comparado aos animais sépticos e sem tratamento. Ainda foi possível observar que o grupo CLP+IDA, apresentou-se diminuído em relação a Sham, em pré-frontal e hipocampo (Figura 37), e em relação ao grupo CLP+DEX em pré-frontal e amígdala (Figura 36). Já o grupo que recebeu os dois medicamentos, se comportou de maneira diferente dependendo da estrutura, já que em pré-frontal IDA foi capaz de bloquear os efeitos de DEX, apresentando níveis diminuídos de Bcl-2 tanto em relação a Sham quanto DEX, mas na amígdala, IDA não foi capaz de bloquear os efeitos benéficos de DEX, uma vez que o grupo IDA+DEX apresentou níveis elevados de Bcl-2 quanto comparado a CLP e CLP+IDA. 10 dias após os tratamentos, apenas pré-frontal ainda apresentava diferenças significativas entre os grupos, onde os grupos CLP e CLP tratado apenas com IDA apresentavam níveis menores da proteína anti-apoptótica, Bcl-2, quando comparados com o grupo controle e séptico tratado com DEX. O grupo que apresentava ambos os medicamentos, obteve índices maiores desta proteína quando comparado ao grupo que recebeu apenas IDA, demonstrando que não foi possível um total bloqueio de DEX pelo antagonista IDA. Aos 30 dias após os tratamentos apenas na amígdala o grupo CLP ainda estava diminuído em relação a Sham.

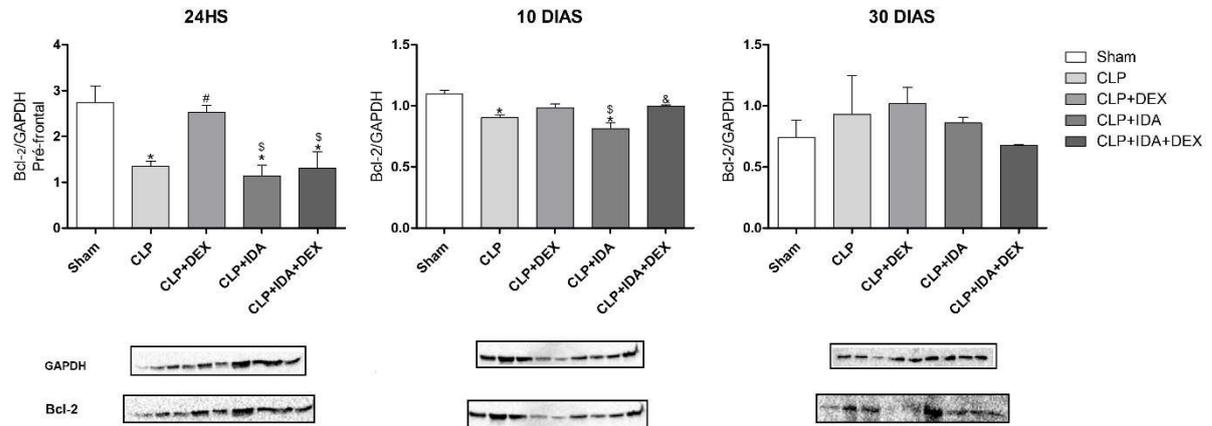


Figura 35. Níveis de Bcl-2 em pré-frontal após indução de sepse e tratamentos. Os animais foram submetidos a CLP ou cirurgia simulada (Sham) e 24hs, 10 e 30 dias após a tratamentos os animais foram eutanasiados e o pré-frontal foi removido para a determinação dos níveis de Bcl-2. As imunotransferências representativas de amostras individuais de diferentes animais são mostradas. n = 4 cada grupo. As bandas foram quantificadas pelo software ImageJ. *diferente de Sham; # diferente de CLP; & diferente de CLP+ IDA; \$ diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média±DP. $p < 0,05$.

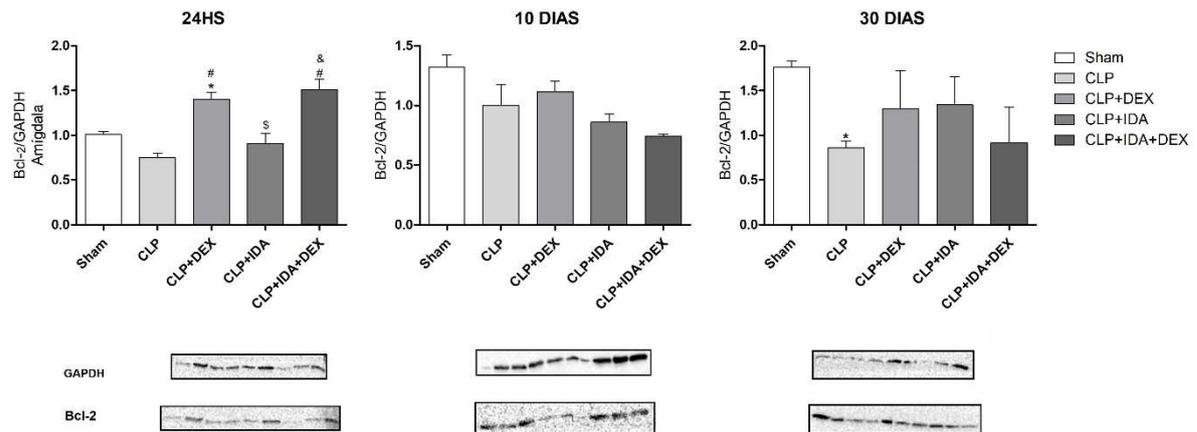


Figura 36. Níveis de Bcl-2 em amígdala após indução de sepse e tratamentos. Os animais foram submetidos a CLP ou cirurgia simulada (Sham) e 24hs, 10 e 30 dias após a tratamentos os animais foram eutanasiados e a amígdala foi removida para a determinação dos níveis de Bcl-2. As imunotransferências representativas de amostras individuais de diferentes animais são mostradas. n = 4 cada grupo. As bandas foram quantificadas pelo software ImageJ. *diferente de Sham; # diferente de CLP; & diferente de CLP+ IDA; \$ diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média±DP. $p < 0,05$.

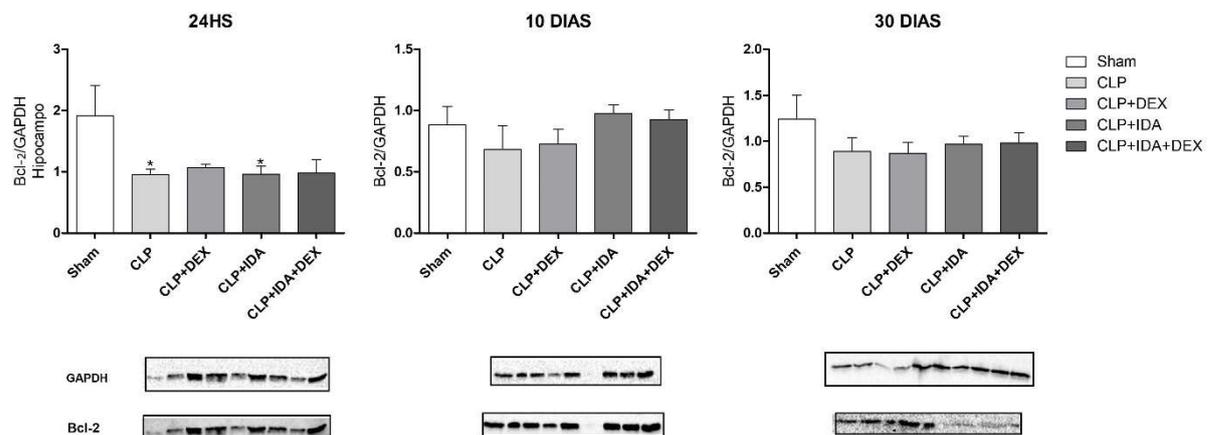


Figura 37. Níveis de Bcl-2 em hipocampo após indução de sepse e tratamentos. Os animais foram submetidos a CLP ou cirurgia simulada (Sham) e 24hs, 10 e 30 dias após a tratamentos os animais foram eutanasiados e o hipocampo foi removido para a determinação dos níveis de Bcl-2. As imunotransferências representativas de amostras individuais de diferentes animais são mostradas. n = 4 cada grupo. As bandas foram quantificadas pelo software ImageJ. *diferente de Sham. Dados foram expressos como média±DP. p<0,05.

5.6 NÍVEIS PROTEICOS DE PSD-95

Sabendo que a sepse pode causar danos cognitivos em pacientes sobreviventes, através de mecanismos de neuroinflamação e danos na plasticidade sináptica, foram dosados níveis da proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD-95), com a finalidade de observar a neuroproteção associada a DEX. Em 24 horas após os tratamentos, foi observado que os níveis de PSD-95 estavam diminuídos em CLP, comparado a Sham no hipocampo e que em pré-frontal (Figura 38), DEX foi capaz de aumentar os níveis da mesma, quando comparado com o grupo séptico sem tratamento. Sendo que o grupo que recebeu apenas IDA, apresentava níveis significativamente menores desta proteína quando comparado ao grupo que recebeu apenas DEX. Não houve diferenças significativas na amígdala (Figura 39) em nenhum dos tempos. Já no hipocampo (Figura 40) ambos os grupos que receberam IDA ainda apresentavam níveis diminuídos desta proteína em relação a Sham.

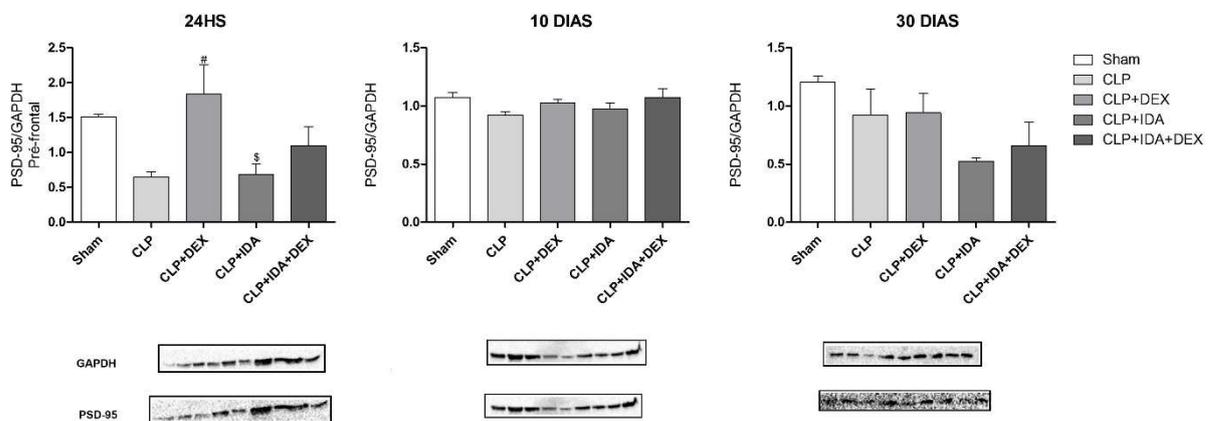


Figura 38. Níveis de PSD-95 em pré-frontal após indução de sepse e tratamentos. Os animais foram submetidos a CLP ou cirurgia simulada (Sham) e 24hs, 10 e 30 dias após a tratamentos os animais foram eutanasiados e o pré-frontal foi removido para a determinação dos níveis de Bcl-2. As imunotransferências representativas de amostras individuais de diferentes animais são mostradas. n = 4 cada grupo. As bandas foram quantificadas pelo software ImageJ. # diferente de CLP; § diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média±DP. p<0,05.

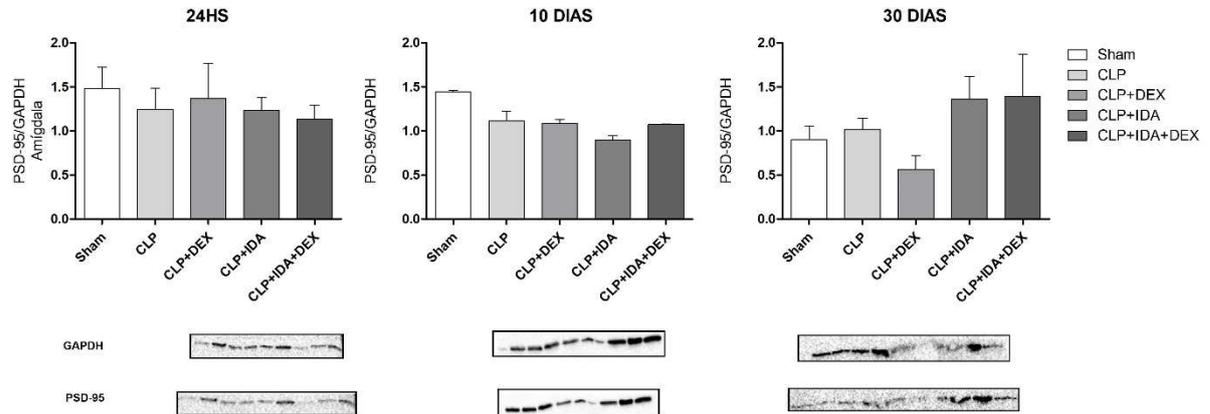


Figura 39. Níveis de PSD-95 em amígdala após indução de sepse e tratamentos. Os animais foram submetidos a CLP ou cirurgia simulada (Sham) e 24hs, 10 e 30 dias após a tratamentos os animais foram eutanasiados e a amígdala foi removida para a determinação dos níveis de Bcl-2. As imunotransferências representativas de amostras individuais de diferentes animais são mostradas. $n = 4$ cada grupo. As bandas foram quantificadas pelo software ImageJ. Dados foram expressos como média \pm DP. $p < 0,05$.

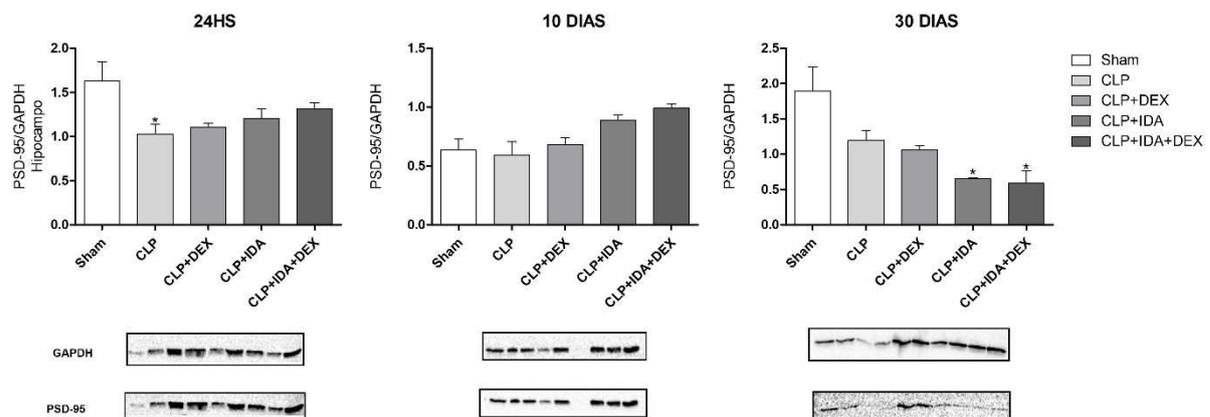


Figura 40. Níveis de PSD-95 em hipocampo após indução de sepse e tratamentos. Os animais foram submetidos a CLP ou cirurgia simulada (Sham) e 24hs, 10 e 30 dias após a tratamentos os animais foram eutanasiados e o hipocampo foi removido para a determinação dos níveis de Bcl-2. As imunotransferências representativas de amostras individuais de diferentes animais são mostradas. $n = 4$ cada grupo. As bandas foram quantificadas pelo software ImageJ. *diferente de Sham. Dados foram expressos como média \pm DP. $p < 0,05$.

5.7 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

5.7.1 Comportamento: 10 dias após os tratamentos

O aprendizado e a memória foram avaliados através dos testes de esQUIVA INIBITÓRIA, reconhecimento de novos objetos e habituação ao campo aberto, 10 e 30 dias após os tratamentos. 10 dias após, foi possível observar que tanto animais controles quanto os animais sépticos que receberam DEX foram capazes de reter a memória de longa duração no teste de esQUIVA INIBITÓRIA (Figura 41), demonstrando uma diferença significativa no tempo de latência no teste, uma vez que foram capazes de lembrar do choque obtido durante o período de treino.

Já os animais do grupo CLP, CLP+IDA e CLP+IDA+DEX não foram capazes de reter a memória, não apresentando uma diferença no tempo de latência entre treino e teste.

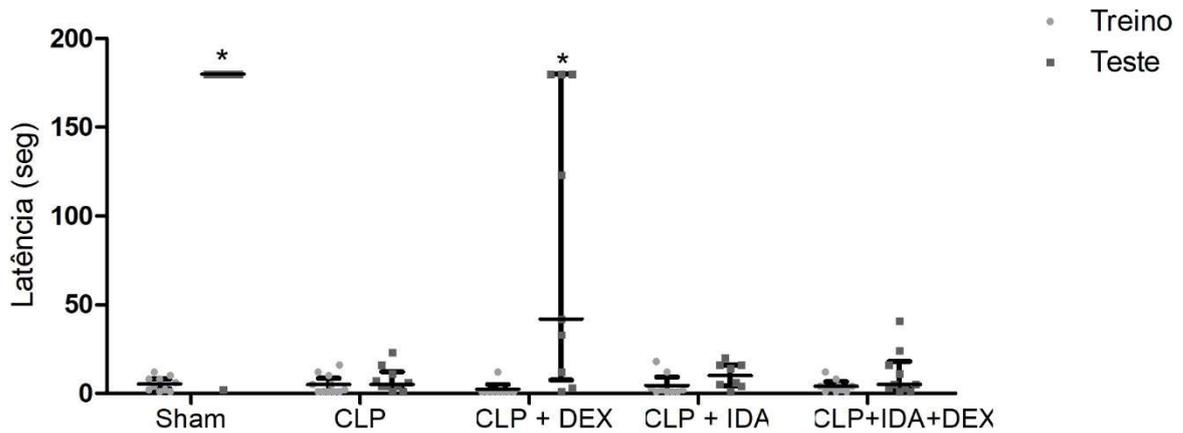


Figura 41: Teste de esquiva inibitória. Em 10 dias após o tratamento, foi realizado o treino dos animais no aparelho e 24 horas após, realizou-se o teste. Valores expressos como mediana+intervalo interquartil, treino e teste comparados através do teste de Wilcoxon. * $p < 0,05$ versus treino do mesmo grupo.

A memória dos animais também foi analisada através do teste de reconhecimento de novos objetos (Figura 42) e assim como no teste de esquiva, apenas os grupos Sham e CLP+DEX foram capazes de obter índices de reconhecimento significativamente aumentados no teste em relação ao treino, demonstrando que foram capazes de reter a memória de objetos apresentados anteriormente. Novamente os grupos CLP, CLP+IDA e CLP+IDA+DEX não foram capazes e consolidar a memória de reconhecimento.

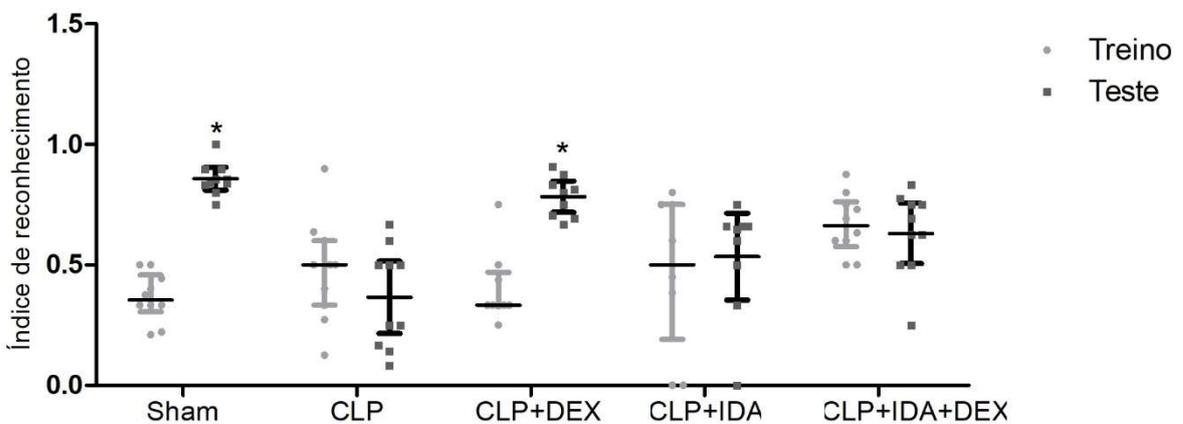


Figura 42: Reconhecimento de novos objetos. Os animais foram submetidos a sham ou sepse por ligação e perfuração cecal (CLP). Em 10 dias após tratamentos, foi realizado o treino dos animais e 24 horas após, realizou-se o teste com

um novo objeto. Valores expressos como mediana+intervalo interquartil, treino e teste comparados através do teste de Wilcoxon. $*p < 0,05$ versus treino do mesmo grupo.

Por fim, foi realizado também o teste de habituação em campo aberto (Figura 43), que avalia a memória de habituação, onde os cruzamentos e levantamentos dos animais são observados a fim de analisar a exploração dos mesmos durante o treino e o teste, realizado com uma diferença de 24 horas. Entrando de acordo com os últimos resultados, ambos os grupos Sham e CLP+DEX foram capazes de reter a memória, apresentando número de cruzamentos e levantamentos diminuídos no teste em relação ao treino. Já os grupos CLP+IDA e CLP+IDA+DEX apresentaram diferenças estatísticas em apenas um dos parâmetros avaliados.

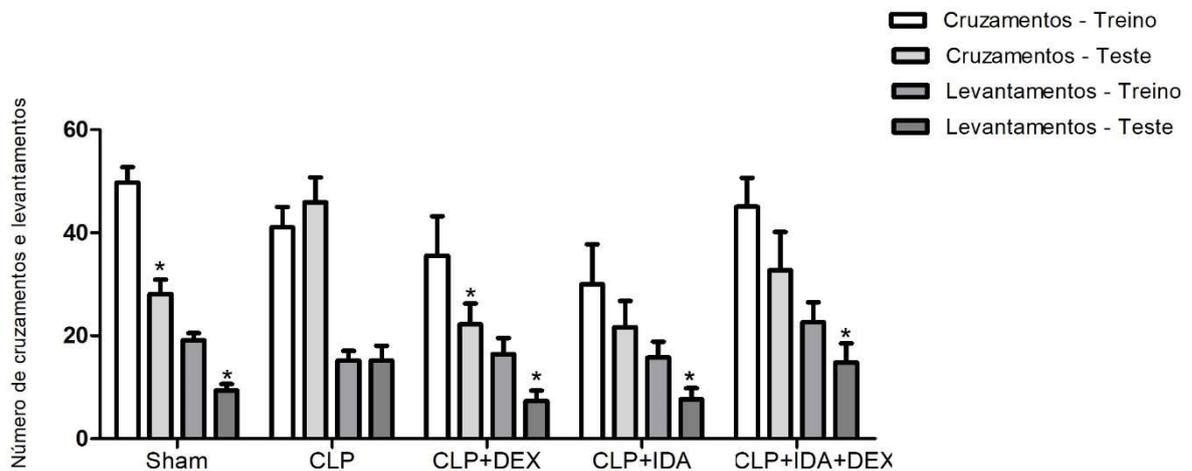


Figura 43: Habituação a campo aberto. Em 10 dias após a indução de sepse, foi realizado o treino dos animais e 24 horas após foi realizada a sessão teste e foi comparado as médias do número de *crossing* e as *rearing*. As barras representam a média \pm EPM, calculados por Teste T pareado. $*p < 0,05$ versus treino do mesmo grupo.

5.7.2 Comportamento: 30 dias após os tratamentos

Assim como em 10 dias, os animais foram avaliados também 30 dias após os tratamentos com os mesmos testes. No teste de esquiiva inibitória (Figura 44), os animais do grupo Sham e CLP+DEX permaneceram apresentando uma diferença no tempo de latência, demonstrando a preservação da memória, porém o grupo CLP+IDA+DEX, também foi capaz de apresentar essa diferença significativa entre treino e teste, hipotetiza-se que IDA não foi capaz de bloquear os efeitos neuroprotetores de DEX.

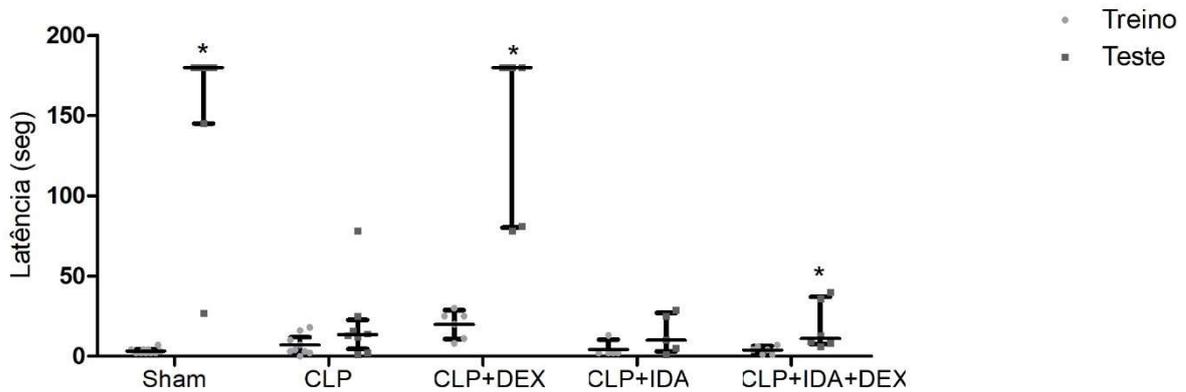


Figura 44: Teste de esquiva inibitória. Em 30 dias após o tratamento, foi realizado o treino dos animais no aparelho e 24 horas após, realizou-se o teste. Valores expressos como mediana+intervalo interquartil, treino e teste comparados através do teste de Wilcoxon. * $p < 0,05$ versus treino do mesmo grupo.

Entrando de acordo com o padrão dos resultados avaliados anteriormente, ambos os grupos controle e sepse tratados com DEX foram capazes de reter a memória de reconhecimento (Figura 45), mesmo 30 dias após o tratamento. Já os animais sépticos sem tratamento ou tratados com IDA não foram capazes de obter um índice de reconhecimento significativamente elevado no período de teste. Demonstrando assim um déficit ocasionado na memória.

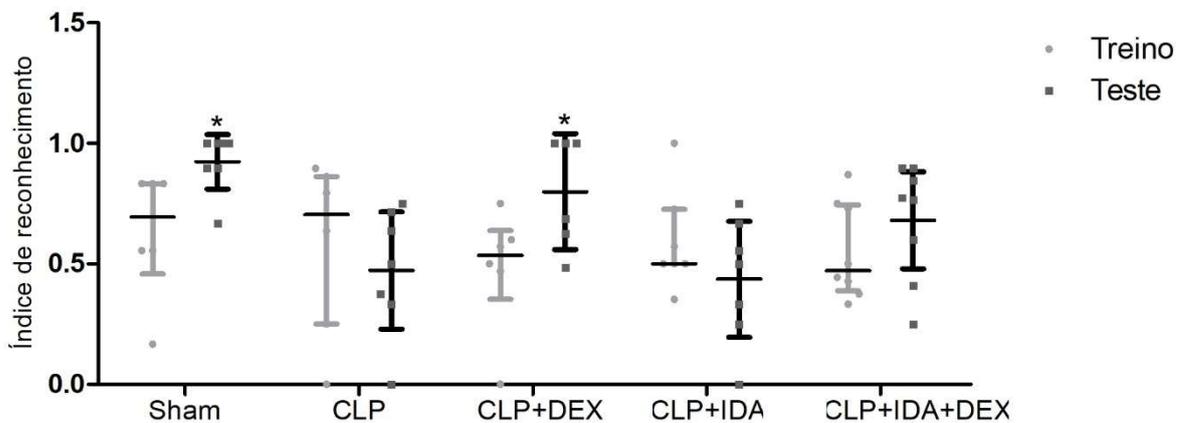


Figura 45: Reconhecimento de novos objetos. Os animais foram submetidos a sham ou sepse por ligação e perfuração cecal (CLP). Em 30 dias após tratamentos, foi realizado o treino dos animais e 24 horas após, realizou-se o teste com um novo objeto. Valores expressos como mediana+intervalo interquartil, treino e teste comparados através do teste de Wilcoxon. * $p < 0,05$ versus treino do mesmo grupo.

A memória de habituação (Figura 46) foi também avaliada 30 dias após os tratamentos e novamente os grupos Sham e CLP+DEX foram capazes de demonstrar diferenças significativas entre treino e teste, tanto no número de levantamentos quanto de cruzamentos, reforçando a capacidade destes animais em reter memória. Aos 30 dias, o grupo CLP+IDA apresentou diferença estatística apenas no número de levantamentos.

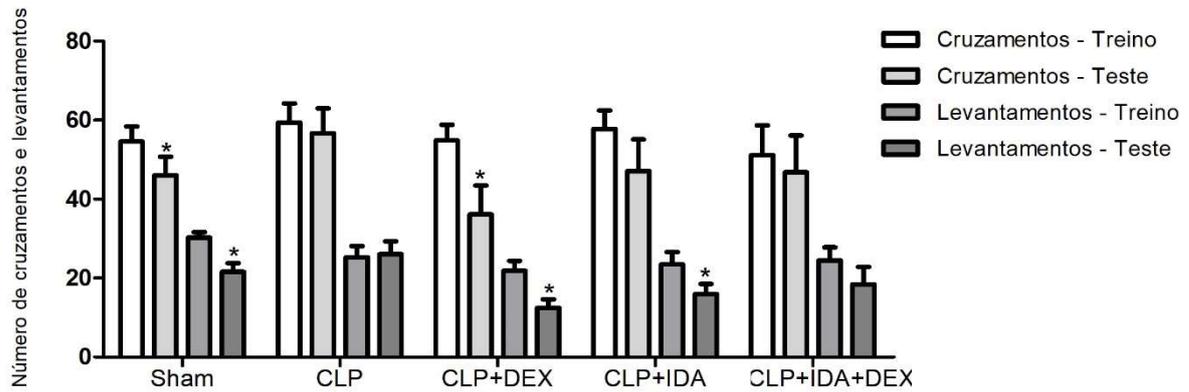


Figura 46: Habituação a campo aberto. Em 30 dias após a indução de sepse, foi realizado o treino dos animais e 24 horas após foi realizado a sessão teste comparado as médias do número de *crossing* e as *rearing*. As barras representam a média \pm EPM, calculados por Teste T pareado. * $p < 0,05$ versus treino do mesmo grupo.

5.8 SOBREVIVÊNCIA

Segundo a Figura 47, o percentual de sobrevivência dos animais submetidos a sepse e não tratados foi cerca de 50%, sendo este o grupo que apresentou a maior mortalidade. Já o grupo séptico tratado apenas com IDA a sobrevivência foi um pouco maior, em torno de 55%. Seguindo então dos grupos CLP+ DEX e CLP+IDA+DEX, que apresentaram índices de sobrevivência semelhantes ao final dos 10 dias, cerca de 60%, porém do 5º ao 9º dia, a sobrevivência do grupo DEX se apresentava maior em relação ao grupo DEX+IDA. Enquanto nos animais dos grupos sham, a taxa ficou em cerca de 90%, representando o grupo com menor mortalidade, como o esperado, sendo o percentual de sobrevivência significativamente maior do que todos os grupos CLP, com ou sem tratamentos.

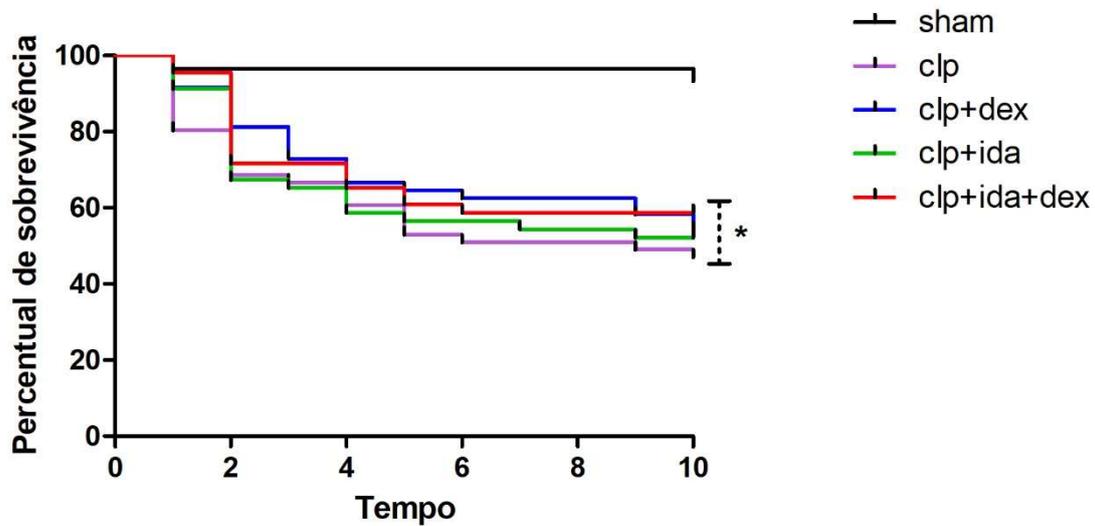


Figura 47: Representação gráfica da curva de sobrevivência. Curva de sobrevivência de tempos de Kaplan-Meier após a indução da sepse. Os dados foram analisados por log-rank. $p < 0,05$.

ETAPA II – TRATAMENTO TARDIO (15 DIAS APÓS INDUÇÃO DE SEPSE)

A fim de observar se a DEX é capaz de proteger contra os danos cognitivos causados pela sepse, mesmo com um tratamento tardio e não concomitante com o desenvolvimento agudo da doença, foram realizados testes comportamentais e foi também realizada a avaliação da ativação microglial através de imuno-histoquímica de IBA-1. Para isto, foi realizado a indução de CLP nos animais, porém o tratamento com IDA e/ou DEX foi realizado somente 15 dias após a indução da doença. Desta maneira foi avaliado comportamento logo após o fim do tratamento e também 30 dias após a indução da sepse.

5.9 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL (TRATAMENTO TARDIO)

5.9.1 Comportamento logo após os tratamentos

A memória aversiva foi testada logo após o fim dos tratamentos, que tiveram início apenas 15 dias após a sepse. Na tarefa de esquivas inibitória (Figura 48) apenas o grupo CLP sem tratamento não foi capaz de recuperar a memória de habituação. Sendo que os grupos Sham e os grupos que receberam DEX apresentaram maiores tempos de latência na sessão teste, apesar de que o grupo CLP+IDA também tenha apresentado resultados significativamente diferentes entre treino e teste.

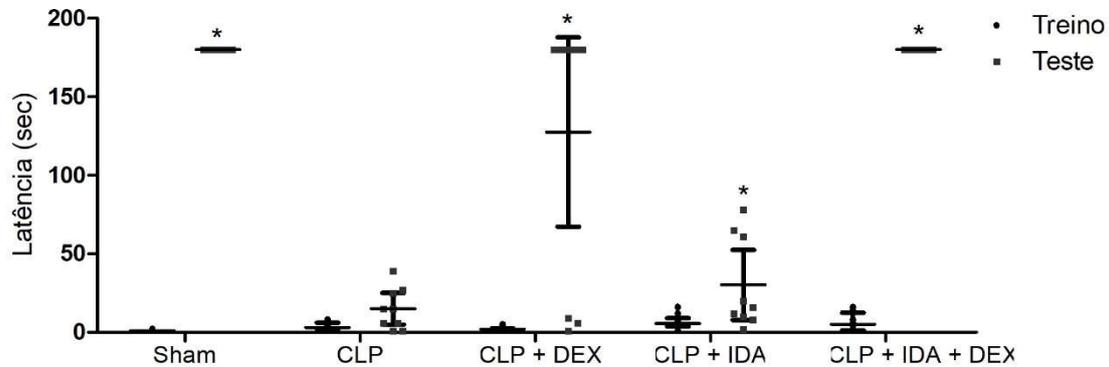


Figura 48: Teste de esquiwa inibitória. Logo após o tratamento em 15 dias, foi realizado o treino dos animais no aparelho e 24 horas após, realizou-se o teste. Valores expressos como mediana+intervalo interquartil, treino e teste comparados através do teste de Wilcoxon. * $p < 0,05$ versus treino do mesmo grupo.

Já quando avaliado a memória de reconhecimento (Figura 49), o mesmo padrão anterior foi observado, onde apenas os grupos controle e CLP+DEX foram capazes de apresentar um aumento no índice de reconhecimento, demonstrando uma preservação desta memória.

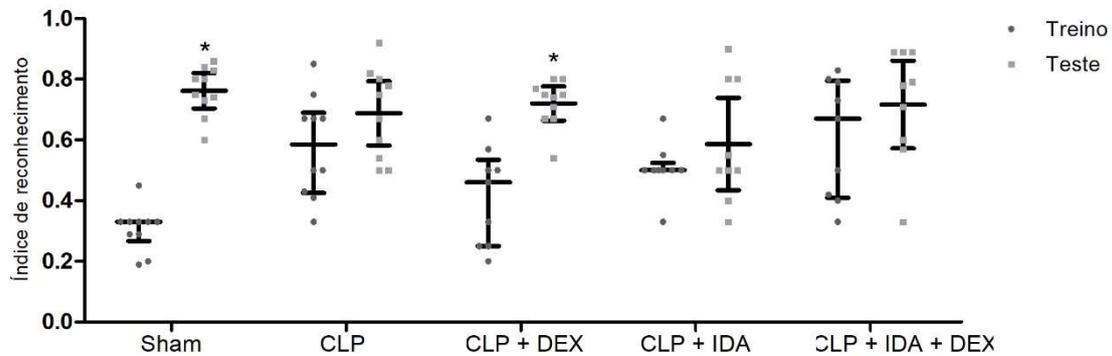


Figura 49: Reconhecimento de novos objetos. Os animais foram submetidos a sham ou sepse por ligação e perfuração cecal (CLP). Logo após tratamentos em 15 dias, foi realizado o treino dos animais e 24 horas após, realizou-se o teste com um novo objeto. Valores expressos como mediana+intervalo interquartil, treino e teste comparados através do teste de Wilcoxon. * $p < 0,05$ versus treino do mesmo grupo.

Na tarefa de habituação a campo aberto (Figura 50), realizada logo após o tratamento tardio, o grupo Sham e curiosamente o CLP+IDA apresentaram diferenças estatísticas entre treino e teste em ambos os parâmetros avaliados e o grupo DEX apenas no número de levantamentos.

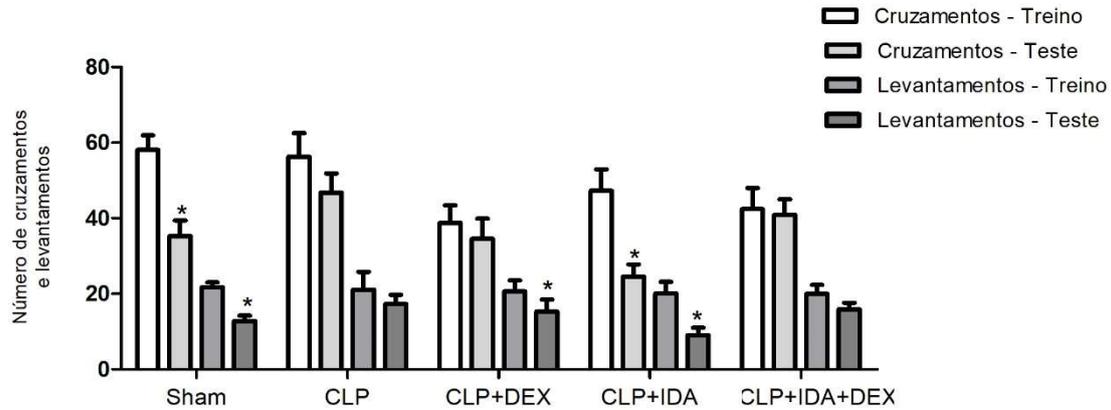


Figura 50: Habituação a campo aberto. Logo após o fim do tratamento em 15 dias, foi realizado o treino dos animais e 24 horas após foi realizado a sessão teste e comparado as médias do número de *crossing* e as *rearing*. As barras representam a média \pm EPM, calculados por Teste T pareado. * $p < 0,05$ versus treino do mesmo grupo.

5.9.2 Comportamento 30 dias após sepse

Foram avaliados também os mesmos testes comportamentais, 30 dias após a indução da sepse, com tratamento em 15 dias pós sepse. Quando avaliado o teste de esquiva inibitória (Figura 51) ambos Sham e CLP+DEX, novamente confirmaram a retenção da memória, por aumentar o tempo de latência entre as sessões treino e teste.

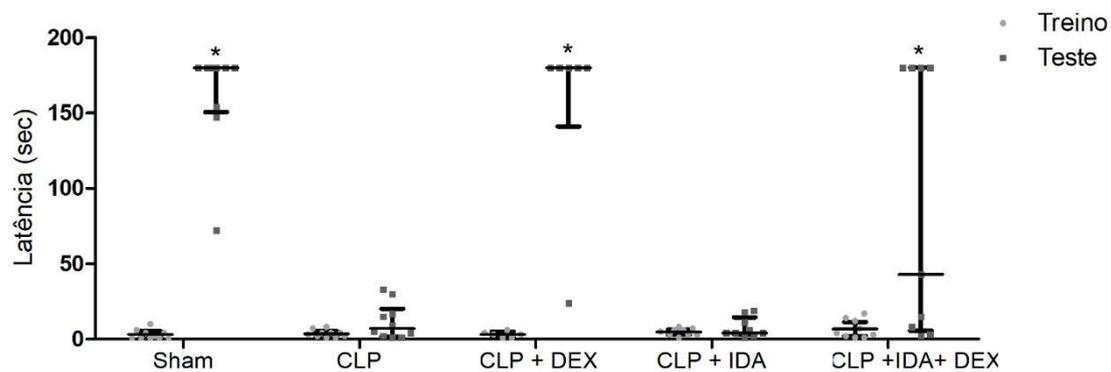


Figura 51: Avaliação da memória aversiva, através das médias do tempo de latência, entre as sessões treino e teste. Valores expressos como mediana+intervalo interquartil, treino e teste comparados através do teste de Wilcoxon * $p < 0,05$ vs treino do mesmo grupo.

Ao avaliar a memória de reconhecimento (Figura 52), novamente os grupos Sham e CLP+DEX foram capazes de reter a memória de reconhecimento e assim aumentar os índices de reconhecimento entre sessões treino e teste, demonstrando que mesmo com tratamento tardio, DEX ainda é capaz de agir a favor da proteção a memória.

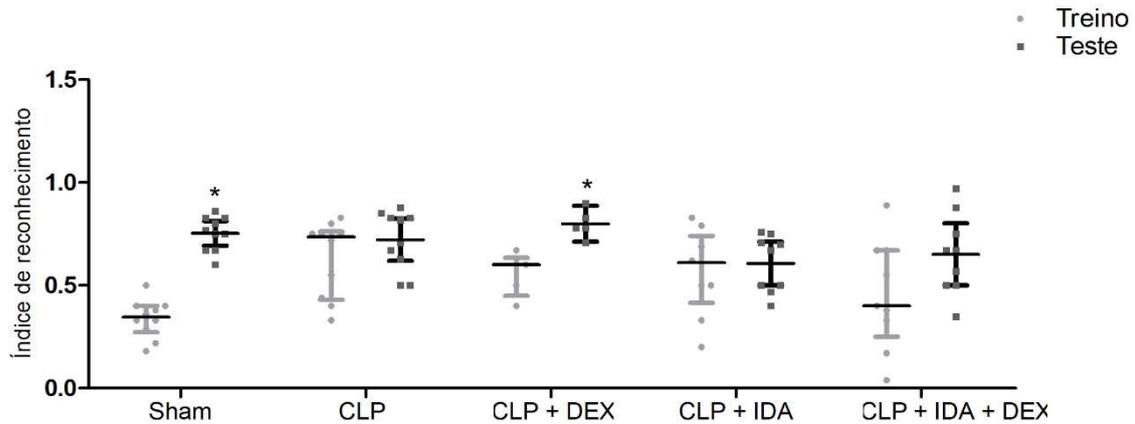


Figura 52: Avaliação de memória de reconhecimento 30 dias após sepse com tratamento tardio, através do índice de reconhecimento entre as sessões treino e teste. Valores expressos como mediana+intervalo interquartil, treino e teste comparados através do teste de Wilcoxon * $p < 0,05$ vs Treino do mesmo grupo.

Para finalizar, foi avaliado o teste de habituação a campo aberto (Figura 53) 30 dias após sepse, com tratamento tardio e pode-se observar que novamente os grupos Sham e CLP+DEX foram capazes de reter a memória de habituação em ambos os parâmetros avaliados, porém os grupos IDA e IDA+DEX foram capazes de apresentar diferenças estatísticas significativas entre sessão treino e teste em apenas um dos parâmetros, no número de levantamentos.

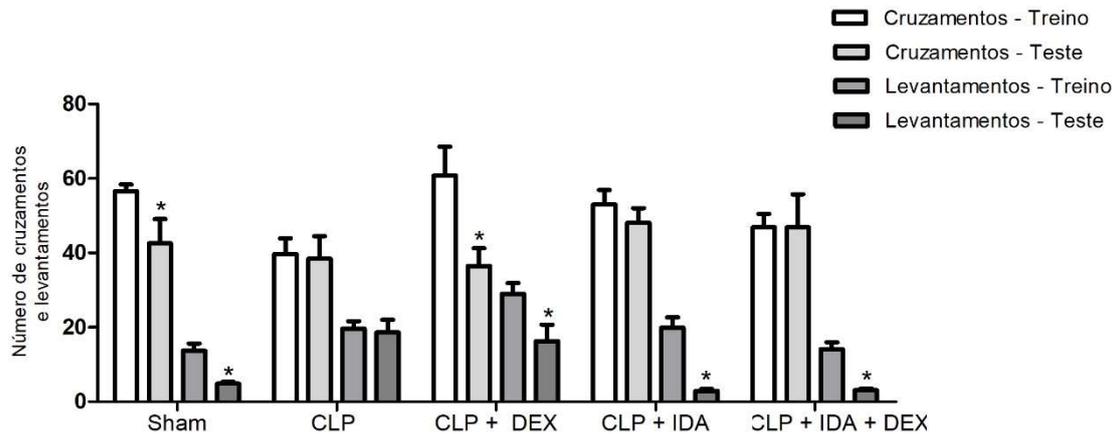
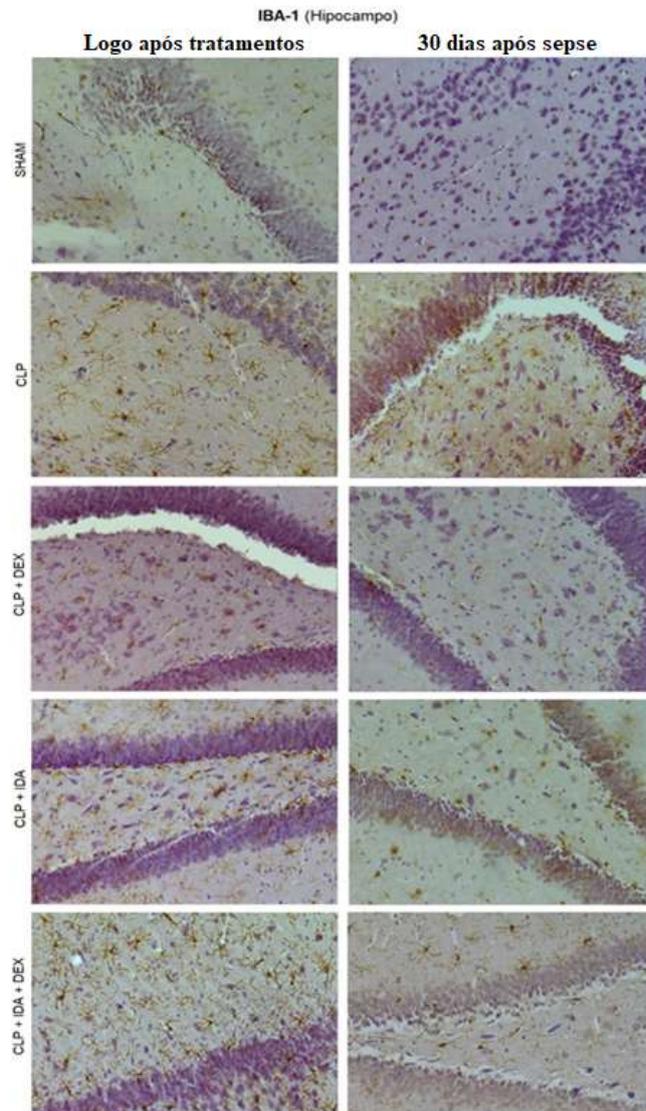


Figura 53: Avaliação de memória de habituação 30 dias após sepse com tratamento tardio, entre as médias do tempo de número de *crossing* e *rearing* entre as sessões treino e teste. Valores expressos como média+erro padrão da média. Sessão treino e teste comparadas por Teste t pareado * $p < 0,05$ vs Treino do mesmo grupo.

5.10 ATIVAÇÃO MICROGLIAL (TRATAMENTO TARDIO)

Após verificar os testes comportamentais, foi realizado também a imuno-histoquímica de IBA-1 (Figura 54) em hipocampo de ratos tratados ou não com DEX e/ou IDA, logo após o tratamento tardio e 30 dias após a indução da sepse, com tratamento também tardio. E foi possível observar que logo após o tratamento, o grupo CLP, CLP+IDA e CLP+IDA+DEX ainda mantinham um número de células imunopositivas para IBA-1 aumentadas em relação ao grupo controle e ao grupo que recebeu DEX. E que 30 dias após a sepse, apenas o grupo CLP ainda mantinha estes níveis elevados, comprovando que mesmo após 30 dias ainda ocorre ativação microglial pós sepse



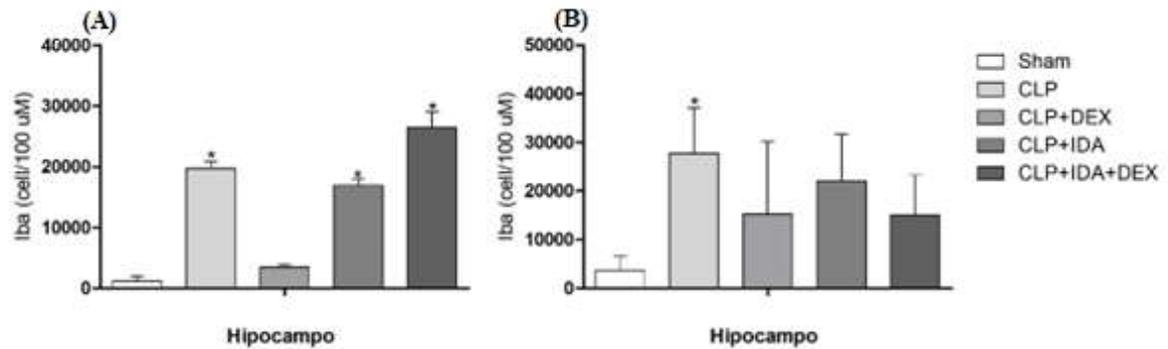


Figura 54: Determinação de células positivas para IBA-1, em hipocampo, por imuno-histoquímica. (A) logo após tratamentos; (B) 30 dias após sepse. As células imunopositivas aparecem em marrom e foram expressas como porcentagem da área total analisada. $n = 5$ cada grupo. Ampliação original 20X. As células imunopositivas foram quantificadas pelo software ImageJ. *diferente de Sham; # diferente de CLP; \$ diferente de CLP+ IDA; & diferente de CLP+ DEX. Dados foram expressos como média±DP. $p < 0,05$.

Resumo dos resultados nos anexos C, D, E, F e G.

6 DISCUSSÃO

A sepse é uma doença que apresenta altos índices de mortalidade e aqueles pacientes que sobrevivem acabam por desenvolver danos cognitivos que culminam em uma piora na qualidade de vida dos mesmos (Iwashyna et al., 2010). A encefalopatia séptica pode estar presente em mais de 70% dos pacientes e tem sido descrita como um evento que pode contribuir para a ocorrência de déficit cognitivo prolongado (Tauber et al., 2020). Visto isso, este estudo buscou compreender o papel da DEX, um fármaco clinicamente disponível, com a finalidade de avaliar a capacidade deste medicamento em reduzir alterações cognitivas sabidamente causadas pela sepse, compreender melhor a fisiopatologia da doença, bem como facilitar a transição para a prática médica.

Estudos recentes vêm apontando os efeitos benéficos deste medicamento através da sua ligação com o receptors α 2-adrenérgicos (Weng et al., 2019; Mei et al., 2021; Zhang et al., 2021). Dentre os efeitos estudados em relação ao uso da DEX, destaca-se a propriedades anti-inflamatórias (Zamani et al., 2016), antioxidante (Sahin et al., 2013), ação neuroprotetora (Zhou et al., 2018), diminuição de *Delirium* e consequente diminuição do tempo de internação (Duan et al., 2018), capacidade de regular vias apoptóticas (Zhang et al., 2020) e ainda contribuir para redução de disfunção cognitiva (Mei et al., 2021).

A DEX é um potente agonista de receptores α 2-adrenérgicos, desta maneira são capazes de se ligarem fortemente a este receptor, possuindo uma razão de 1600:1 em relação a sua ligação com os receptores α 1-adrenérgicos e desencadeiam respostas benéficas através desta ligação, culminando na diminuição na liberação de noradrenalina e glutamato na fenda sináptica (Chen et al., 2018). Os receptores α 2-adrenérgicos, podem ser divididos em três subtipos, α 2_A, 2_B e 2_C. Porém apenas os receptores α 2_A e α 2_C estão envolvidos no mecanismo de *feedback* negativo que regula a liberação pré-sináptica de neurotransmissores nos nervos adrenérgicos (Philipp et al., 2002). Os receptores α 2_A estão ligados a sedação, ansiólise, analgesia, vasodilatação e neuroproteção, os α 2_B com a vasoconstrição, analgesia espinhal e aumento de diurese, já os α 2_C com sedação, cognição, processamento sensorial e humor (Bulow et al (2014). No presente estudo, foi dosado através da técnica de PCR, a expressão de receptores α 2_A e α 2_C, que são os subtipos que apresentam uma correlação direta com os efeitos de neuroproteção e cognição, uma vez que estes parâmetros são alterados durante o curso da sepse (Tauber et al., 2021). Posteriormente estes efeitos foram também explorados através de

outras técnicas, a fim de melhor compreender a relação do fármaco utilizado e as consequências clínicas da sepse.

Ambas expressões dos receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos apresentaram-se sem diferenças entre os grupos nos tempos de 24 horas e 30 dias, apenas em 10 dias houve diferença estatística significativa em ambos os receptores. Nos receptores α_{2A} , relacionados a neuroproteção, os grupos que receberam algum tipo de tratamento, apresentaram níveis diminuídos da expressão deste receptor em todas as estruturas avaliadas, podendo ser um indicativo de que em 24 horas ainda não havia um número de ligações suficientes para que ocorresse uma diminuição da expressão dos receptores, como ocorreu em 10 dias. Em 30 dias, as expressões do receptor já retornaram a normalidade, não apresentando diferenças entre os grupos. O mesmo padrão foi observado com os receptores α_{2C} , relacionados a cognição, já que em 10 dias, apenas os grupos que receberam doses de DEX apresentaram expressões diminuídas em relação aos demais grupos. Demonstrando assim, a potente ligação da DEX com estes receptores, que culmina em respostas duradouras, tanto a nível celular quanto clínico.

A patogênese da sepse está fortemente ligada ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β , TNF- α (Janeway, Travers et al., 2014), o que acarreta a ativação microglial, com conseqüente exacerbação da produção destas mesmas citocinas, o que culmina em danos cognitivo de aprendizagem e comprometimento de memória (Liu et al., 2012). Diversos estudos com DEX vêm demonstrando sua eficácia em suprimir mediadores inflamatórios envolvidos neste processo. Kawasaki et al (2013) em seu experimento *in vitro*, demonstrou que DEX exerce efeitos anti-inflamatórios através de sua ligação com receptores α_2 -adrenérgicos, desencadeando a inibição de NF- $\kappa\beta$ e redução dos níveis de IL-6, TNF- α , IL-8 e HMGB1. Yuan et al (2017), em seu estudo sobre isquemia/reperfusão, demonstrou que DEX na dose de 50 ug/kg foi capaz de prevenir danos neurológicos, diminuir a atividade de enzimas pro-oxidantes como a mieloperoxidase e também malondialdeído e diminuir níveis de citocinas pro inflamatórias (IL-6 e TNF- α) no plasma. O mecanismo protetor de DEX foi também avaliado em um modelo de lesão renal aguda induzida por LPS, onde foi observado que DEX na dose de 30ug/kg foi capaz de inibir a ativação de NF- $\kappa\beta$, fosforilação de I-Kappa β (Ik β), bem como as expressões de proteínas associadas ao inflamassoma NLRP3 e ativação consecutiva de IL-18 e IL-1 β (Yao et al., 2019). Em um estudo sobre privação de sono, animais que utilizaram DEX foram capazes de suprimir mediadores inflamatórios (TNF- α e IL-6),

reduzir expressão de IBA-1 e apresentaram uma melhora na aprendizagem espacial e memória de curto prazo (Hwang et al., 2019). De acordo com Ji et al (2017) DEX reduz a produção destas citocinas inflamatórias através da inibição da via de sinalização TLR4/NF-KB/p65 em um modelo de monoartrite em ratos. A administração de DEX via ativação de $\alpha 2$ -adrenoreceptores em ratos durante o curso da inflamação foi capaz de prevenir neuroinflamação hipocampal, diminuir a superexpressão de TLR4 na micróglia, com consequente melhora na função cognitiva (Yamanaka et al., 2016).

Devido aos fortes indícios da DEX ser capaz de reduzir citocinas inflamatórias que estão elevadas na sepse, no presente trabalho foi analisado a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 β e da anti-inflamatória IL-10, 24 horas, 10 e 30 dias após a administração de DEX. Com relação aos níveis séricos, como esperado as citocinas IL-6 e IL-1 β estavam aumentadas em 24 horas em animais sépticos. DEX conseguiu diminuir os níveis de IL-6, porém IDA também foi capaz de causar essa diminuição. Em 10 dias, apenas IL-1 β ainda apresentou diferenças significativas, onde CLP apresentava ainda índices aumentados em relação ao grupo tratado com DEX sozinho ou associado a IDA. Aos 30 dias após os tratamentos, as citocinas já voltaram a níveis basais. Já os níveis de IL-10, citocina anti-inflamatória, estavam diminuídos em ambos os grupos que receberam IDA, em 24 horas e este resultado foi estendido até 10 dias. Entrando em acordo com dados de Michels et al (2020), que demonstrou a cinética de citocinas de animais sépticos, onde níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β já estão alterados em 24 horas, permanecem aumentados até 10 dias após sepse, voltando aos níveis basais em 30 dias.

Quando dosadas estas citocinas em hipocampo, pré-frontal e amígdala, foi observado que cada estrutura apresentou diferenças tanto em questão de qual citocina apresentava-se alterada, quanto ao tempo avaliado. Em pré-frontal, houve aumento das citocinas pró-inflamatórias em 24 horas no grupo séptico e DEX foi capaz de diminuir, assim como IDA aumentou estes níveis, sendo que permaneceram elevados ou até 10 dias (IL-6) ou até 30 dias (IL-1 β). No hipocampo, também ocorreu o aumento de IL-6 no grupo sepse tanto em 24 horas e em 30 dias. Aos 10 dias a DEX conseguiu diminuir níveis de IL-1 β , e aos 30 dias de IL-6. Já na amígdala a diferença ocorreu apenas aos 10 dias, onde IL-1 β estava elevado no grupo sepse e os grupos que receberam DEX conseguiram diminuir os níveis desta citocina pró-inflamatória. De maneira geral observou-se o aumento de citocinas pró-inflamatórias em CLP divergindo em

qual tempo e qual citocina dependendo da estrutura analisada, bem como a diminuição das mesmas quando utilizado DEX. IDA parece contribuir para o aumento de citocinas inflamatórias. Quanto a citocina anti-inflamatória IL-10, DEX foi capaz de aumentar esta citocina em 24 horas em todas as estruturas avaliadas, sem apresentar diferenças em 10 e 30 dias.

A microglia ativada é o principal regulador da neuroinflamação no SNC através da produção e liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias e glutamato (Norden et al., 2013; Perry et al., 2014). Uma vez que o aumento de citocinas pró-inflamatórias causa ativação microglial (Giulian et al., 1988) e esta por sua vez esta relacionada ao surgimento de danos cognitivos (Jeohn et al., 1988), principalmente em hipocampo, estrutura altamente ligada a memória e cognição (Tancredi et al., 1990; Nemni et al., 1992), foi quantificado a ativação de IBA-1, através de imuno-histoquímica, com intuito de avaliar a ativação microglial em 24 horas, 10 e 30 dias. Em 24 horas não houve diferenças em relação a imunopositividade das células para IBA-1. Em 10 dias, o grupo séptico e o grupo IDA+DEX apresentaram aumento da imunopositividade e em 30 dias ambos os grupos que receberam IDA, estavam elevados em relação ao grupo DEX. Com relação etapa II, também foi realizado a quantificação da ativação microglial através de IBA-1, tanto quando avaliado logo após o tratamento quanto 30 dias após sepse, a imunopositividade de IBA-1 em CLP demonstrou-se aumentada em relação ao grupo Sham. Logo após o tratamento tardio, os dois grupos que receberam IDA apresentavam uma ativação microglial aumentada em relação a sham. Já em 30 dias só houve diferença significativa entre sham e clp, os grupos tratados não apresentaram diferenças significativas em relação aos demais grupos. Desta maneira fica evidente que a sepse causa aumento na ativação microglial, apesar de que em 24 horas ainda não foi possível observar este fato. Diversos estudos já demonstraram a capacidade deste medicamento (DEX) em diminuir a ativação microglial, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Xu et al., 2010; Zhou et al., 2014; Li et al., 2021; Yeh et al., 2018). Como por exemplo, um estudo de Ta Na et al (2022), realizado com camundongos submetidos a lesão na medula espinhal por isquemia/reperfusão, DEX foi capaz de acelerar a degradação de HMGB1, permitindo a inibição da ativação microglial. Conforme Li et al., (2021), agonistas dos receptores α 2-adrenérgicos, como por exemplo a DEX, são capazes de conduzir uma mudança no fenótipo microglial M1, pró-inflamatório, para M2, anti-inflamatório. E de acordo com Michels et al (2020), a polarização microglial M1, pode causar

ativação microglial e em contrapartida, o fenótipo M2 pode apresentar papel de recuperação a longo prazo.

Sabendo que a ativação microglial está ligada ao desenvolvimento da neuroinflamação e por consequência acarreta danos neurológicos e comportamentais (Lynch et al., 2010), foi avaliado a memória e aprendizado destes animais através dos seguintes testes comportamentais: habituação a campo aberto (memória de habituação), reconhecimento de novos objetos (memória de reconhecimento) e esquiiva inibitória (memória aversiva), nos tempos de 10 e 30 dias após os tratamentos. Segundo Lynch (2010), o aumento de citocinas inflamatórias no cérebro afeta profundamente o comportamento, especificamente afetando a aprendizagem dependente de hipocampo e Moore et al (2009) afirmam que a ativação microglial é acompanhada de efeitos negativos comportamentais. De acordo com Goshen e Yirmiya (2009), IL-1 β é capaz de modular o comportamento exploratório e interação social.

Em um estudo de Zhang et al (2019), DEX foi capaz de melhorar a memória e aprendizagem espacial em filhotes de ratos, promovendo neurogênese hipocampal e plasticidade sináptica. No estudo de Su et al (2015), realizado com ratas grávidas, DEX foi capaz de aliviar o comprometimento da aprendizagem espacial e habilidades de memória destas ratas adultas. Assim como Zhang et al (2016), demonstrou que DEX é capaz de melhorar significativamente a capacidade exploratória de ratos, resultando na melhora de parâmetros cognitivos e Hwang et al (2019) demonstraram uma melhora na memória de curto prazo e aprendizagem espacial em modelo de privação de sono. Goyagi (2019), em seu estudo de neurodegeneração causada por sevoflurano em ratos neonatos, apontou que o tratamento com DEX melhorou função cognitiva, aumentou o número de neurônios intactos no córtex, hipocampo e amígdala na vida adulta, indicando que DEX é capaz de atenuar a neurodegeneração induzida por sevoflurano. Outros estudos utilizando isoflurano (Li et al., 2014; Sanders et al., 2010), também demonstraram a capacidade de DEX em aliviar a neuroapoptose e diminuir disfunções cognitivas causadas pela exposição ao isoflurano. De acordo com Yamanaka et al (2016) o tratamento com DEX durante a ativação imune, pode prevenir a neuroinflamação hipocampal induzida pela inflamação sistêmica, assim como diminuir a super expressão de TLR-4 na microglia e consequentes disfunções cognitivas e que estes efeitos são mediados através da ligação de DEX com os receptores α_2A -adrenérgicos.

Em relação aos dados comportamentais foi observado que aos 10 dias, a memória aversiva e de reconhecimento foi mantida nos grupos Sham e no grupo séptico que recebeu DEX. Já no teste de habituação, o mesmo ocorreu com estes grupos mencionados anteriormente. Porém os dois grupos que receberam IDA, foram capazes reter, porém apenas parcialmente a memória de habituação, uma vez que pelo menos o parâmetro de levantamentos foi mantido. O grupo CLP como esperado não conseguiu reter estas memórias, como esperado. Em 30 dias, novamente os grupos Sham e CLP+DEX foram capazes de reter as memórias de habituação, reconhecimento e memória aversiva. Já o grupo sepse sem tratamento não foi capaz de reter memória em nenhum dos testes realizados. Já no teste de habituação, o grupo que recebeu IDA, novamente teve o parâmetro de levantamentos diferente entre treino e teste, mostrando a memória parcialmente adquirida neste grupo. No teste de esquiva inibitória, IDA não foi capaz de bloquear os efeitos benéficos de DEX, uma vez que o grupo IDA+DEX foi capaz de apresentar diferenças estatísticas no tempo de latência, demonstrando reter a memória aversiva. Em relação aos testes comportamentais de maneira geral, foi observado a retenção de memória tanto no grupo saudável, quanto no grupo que recebeu DEX e o mesmo não pode ser observado no grupo sepse sem tratamento. Em relação a IDA, o bloqueio da DEX pareceu de forma parcial, uma vez que em alguns parâmetros avaliados ele não foi capaz de reverter os efeitos benéficos da DEX.

Na etapa II, onde foi utilizado o tratamento de maneira tardia, 15 dias após o início da sepse, os mesmos testes comportamentais foram realizados, a fim de avaliar se a administração de DEX mesmo após sua fase aguda, poderia trazer efeitos benéficos em relação a cognição e memória. Foram realizados testes comportamentais em dois momentos: logo após o fim do tratamento, que foi realizado durante três dias consecutivos, 15 dias após indução da sepse e também 30 dias após a indução da doença. Foi observado que nos três testes avaliados: esquiva inibitória, reconhecimento de novos objetos e habituação a campo aberto, como esperado os grupos sham foram capazes de preservar a memória, não acontecendo o mesmo com os grupos CLP sem tratamento. Em relação a utilização de DEX, nas tarefas de esquiva e reconhecimento, DEX foi capaz de preservar a memória, porém quando avaliado a memória de habituação, esta só foi recuperada parcialmente.

Em relação a utilização de IDA, curiosamente, este foi capaz de auxiliar a memória nos testes de esquiva inibitória e memória de habituação. Apesar do idazoxan ser um

antagonista dos receptores α 2-adrenérgicos, este medicamento é capaz também de se ligar nos receptores de imidazolina do tipo 2 (I_2), com forte afinidade (Regunathan et al., 1996). Pouco se sabe sobre os mecanismos de transdução relacionados ao receptor I_2 , porém em estudos de Maiese et al (1992) e Gustafson et al (1990) com ratos, o tratamento com IDA, foi capaz de proteger o cérebro de isquemia focal, sendo que este efeito não é observado ao utilizar antagonistas seletivos do receptor α 2-adrenérgico. Desta maneira pode-se explicar o fato do tratamento com IDA, em alguns parâmetros demonstrar efeitos diferentes dos esperados em relação a um antagonista de receptores α 2-adrenérgicos, uma vez que podem estar se ligando em outros receptores, como I_2 e desencadear respostas diferentes. Principalmente em doses mais altas, 1,5 a 4,0 mg/kg, IDA foi capaz de atenuar lesão na medula espinhal, através da ativação de astrócitos e redução da ativação microglial (Wang et al., 2009). Em um estudo de Newman-Tancredi et al., (1998), que avaliava as ações dos ligantes dos receptores α 2-adrenérgicos, apenas o antagonista atipamezole e o agonista dexmedetomidina apresentam alta preferência pelos receptores α 2-adrenérgicos.

Ainda na etapa II, também foram avaliados os mesmos testes comportamentais 30 dias após indução de sepse, com tratamento tardio. Concordando com dados anteriores, os grupos sham conseguiram consolidar a memória, diferentemente do grupo CLP não tratado, em todos os testes comportamentais avaliados. DEX foi capaz de preservar a memória também em todos os testes realizados. Os grupos que receberam IDA não foram capazes de preservar memória aversiva e nem de reconhecimento, mas conseguiram consolidar parcialmente a memória de habituação. Nos grupos que receberam os dois fármacos concomitantemente, IDA não foi capaz de bloquear os efeitos benéficos de DEX nas tarefas de esquivia inibitória, e apenas parcialmente na tarefa de habituação a campo aberto. Demonstrando assim os efeitos protetores de DEX em relação a memória, e demonstrando que IDA é capaz de bloquear apenas parcialmente os efeitos de DEX.

Além de causar aumento de citocinas pro inflamatórias, provocar ativação microglial e causar danos comportamentais, a sepse é caracterizada por apresentar uma hiperativação simpática e liberação exacerbada de noradrenalina e glutamato na fenda sináptica (Zhang et al., 2020). Especialmente as citocinas de resposta aguda, TNF- α e IL-1 β são associadas com apoptose neuronal e diminuição de LTP (Wilson et al., 2002; Lynch et al., 2010). O glutamato é um aminoácido presente no SNC e é associado a diversos eventos através da sua

neurotransmissão, tanto fisiológicos quanto patológicos como AVE, trauma, doenças neurodegenerativas (Attwell et al., 2000; Petroff et al., 2002). É capaz de regular a indução ou extinção de sinapses, morte celular e está implicado nos processos de aprendizagem, cognição e memória (Danbolt et al., 2001; Sarichelou et al., 2008). O aumento de glutamato em tecido cerebral presente na sepse (Kurtz; 2016), pode contribuir para apoptose neuronal (Tseng et al., 2010). Apesar deste neurotransmissor ser essencial para a formação de memória, o seu aumento exacerbado, conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica, é um evento que acarreta diversas doenças neurológicas e transtornos psiquiátricos (Valli et al., 2014).

Os neurotransmissores, como por exemplo o glutamato, são armazenados em vesículas pré-sinápticas, e em um cérebro saudável sua liberação e captação são estritamente controlados e dependentes de energia (Janke e Samra, 2006). De acordo com Palmieri et al (2017), a neuroinflamação e o aumento da neurotransmissão glutamatérgica excitatória, leva a uma crise bioenergética e disfunção cerebral. Em um estudo de Kurtz et al (2019) com suínos, a sepse foi induzida e posteriormente avaliado níveis extracelulares de glutamato e glutamina através de microdiálise cerebral, e 6 horas pós sepse, foi demonstrado um aumento no ciclo glutamato-glutamina. Os resultados deste estudo sugerem que nas horas iniciais da sepse há um aumento exacerbado de glutamato, levando ao aumento da demanda metabólica cerebral e que isto poderia aumentar a vulnerabilidade, acarretar insuficiência energética e disfunção cerebral aguda.

Desta maneira, acredita-se que a DEX desenvolva seus efeitos neuroprotetores e anti apoptóticos, provavelmente através da mediação pelos receptores α_2 -adrenérgicos, uma vez que estes demonstram efeitos simpaticolíticos, com diminuição da liberação de glutamato na fenda sináptica. De acordo com Dutta et al (2001), DEX é capaz de agir nos receptores α_2 -adrenérgicos e causar supressão da excitação de nervos simpáticos. Segundo Stout et al (1998), a abertura de canais de NMDA por glutamato durante longos períodos faz com que aumente a concentração de Ca^{+2} no interior dos neurônios e leve a morte celular. De acordo com Goldeberg et al (1993), DEX é capaz de reduzir concentrações intracelulares de Ca^{+2} e em estudos realizados com culturas de células expostas a hipóxia, demonstrou também a redução da concentração intracelular de Ca^{+2} mediado pelo receptor NMDA, o que oferece proteção contra morte neuronal excitotóxica (Bickler et al., 1996; Talke et al., 1996; Petzelt et al., 2004).

Devido estas evidências, foi dosado níveis de glutamato em pré-frontal, hipocampo e amígdala, com a finalidade de avaliar se DEX é capaz de modular níveis de glutamato na sepse, e desta forma regular vias apoptóticas, que foi posteriormente avaliada através da quantificação de BAX e Bcl-2, proteínas relacionadas a apoptose. Através da técnica de HPLC, foi medido os níveis totais de glutamato contidos em cada estrutura cerebral posteriormente mencionadas. Os resultados obtidos em 24 horas demonstram que o grupo que recebeu DEX apresentou níveis aumentados de glutamato nos três tecidos cerebrais avaliados, podendo indicar que através do seu mecanismo de *feedback* negativo, esteja reduzindo a liberação de glutamato na fenda sináptica e que desta maneira poderia estar auxiliando à retomada dos níveis de glutamato a níveis fisiológicos e assim contribuir para redução dos danos causados pela sepse, uma vez que nas horas iniciais da sepse a liberação exacerbada de glutamato leva a um desbalanço no ciclo glutamato/glutamina, com posterior redução de glutamato e aumento da demanda metabólica. Aos 10 dias não houve diferenças estatísticas. Já em 30 dias, os resultados obtidos foram contrários aos observados em 24hs, com aumento de glutamato nas estruturas avaliadas do grupo CLP e diminuição no grupo que recebeu DEX. O cenário instalado aos 30 dias pós sepse difere das 24 horas, uma vez que tardiamente a inflamação aguda e exacerbada já se desinstalou e da espaço para uma inflamação de baixo grau (Boomer et al., 2014), sendo assim a diminuição de glutamato pela DEX pode demonstrar uma possível neuroproteção.

O efeito neuroprotetor da DEX tem sido atrelado a sua capacidade de regular o balanço entre as proteínas pró e anti apoptóticas (Engelhard et al., 2008), uma vez que consegue diminuir a liberação de noradrenalina e glutamato na fenda sináptica e desta maneira regular vias apoptóticas, interferindo na expressão de proteínas como BAX e Bcl-2 (Shu et al., 2014). A proteína Bcl-2 é responsável por promover repressão de morte celular programada, inibindo a translocação do citocromo-c, bloqueando a ativação de caspases e consequentemente do processo de apoptose (Kluck et al., 1997). Já a proteína BAX, é uma proteína atrelada a promoção da apoptose, que através de sua sinalização ativa o sistema caspase (Engelhard et al., 2003; Ying Yuen et al., 2010). Apesar de serem proteínas com funções divergentes e que em pH normal a proteína Bcl-2 possa inibir a atividade de BAX, em um estudo de Patel et al., (1998) foi mostrado que esta interação entre ambas as proteínas não é obrigatoriamente necessária para o funcionamento das mesmas. Além disto, estudos com células mieloides ou

linfóides que superexpressam Bcl-2, promoveram uma melhor sobrevivência em camundongos submetidos a sepse através da técnica de CLP (Hotchkiss et al., 2000).

Estudos vêm apontando a capacidade da DEX em relugar a via apoptótica. Em um modelo de neuroinflamação induzida por LPS, o pré-tratamento com DEX diminuiu TNF- α , MCP-1, IDO1, iNOS e níveis de mRNA de caspase-3 e aumentou expressão de Bcl-2, proteína anti-apoptótica (Yeh et al., 2018). Em estudo de lesão pulmonar, o pré-tratamento com DEX pode aumentar a expressão de Bcl-2, diminuir a expressão de Bax e resultar em um aumento da razão Bcl-2/Bax (Zhang et al., 2019). Assim como no estudo de Zhang et al (2017) o pré-condicionamento com DEX também demonstrou aumentar a relação Bcl-2/Bax, diminuir os níveis de caspase-3 e também diminuir citocromo-c, que é essencial para a progressão da via apoptótica, atenuando assim a apoptose causada por LPS em células epiteliais alveolares humanas. Em um modelo de isquemia/hipóxia, DEX foi capaz de acarretar o aumento da proteína Bcl-2 (Rajakumaraswamy et al., 2006), bem como em um modelo de dano cerebral isquêmico em adultos, houve aumento da expressão de Bcl-2 e Mdm-2 (murine double minute 2) (Sanders et al., 2009).

Desta maneira, foi avaliado níveis das proteínas Bcl-2 e BAX, 24 horas, 10 e 30 dias após a indução de sepse e tratamentos, em pré-frontal, amígdala e hipocampo. Em pré-frontal (24 horas), como esperado, o grupo séptico apresentou a proteína BAX elevada em relação a sham e DEX foi capaz de diminuir esta expressão. Em relação a proteína anti-apoptótica Bcl-2, o grupo séptico apresentou níveis diminuídos em relação aos animais saudáveis, mas DEX conseguiu elevar os níveis desta proteína quando comparado a CLP. IDA, bloqueou os efeitos de DEX. Em 10 dias, tanto o grupo CLP quanto CLP+IDA apresentavam níveis diminuídos de Bcl-2 em relação a sham. Na amígdala em 24 horas, o mesmo padrão obtido em pré-frontal foi observado em relação a proteína BAX, IDA bloqueou os efeitos de DEX. Em 10 dias o grupo que recebeu somente IDA ainda mantinha níveis elevados da proteína apoptótica. Em relação a proteína anti-apoptótica Bcl-2, em 24hs, DEX apresentou elevação da mesma, comparado a sham e CLP. Porém IDA não foi capaz de reverter o efeito benéfico da DEX em aumentar Bcl-2. Em hipocampo, 24 hs, os grupos que receberam IDA apresentaram aumento nos níveis de BAX em relação a CLP e CLP+DEX. Também em 24hs, os níveis de Bcl-2 estavam diminuídos nos grupos CLP e CLP+IDA em relação a sham.

Em princípio, pode-se observar que CLP apresenta aumento de BAX e diminuição da expressão de Bcl-2 e que DEX é capaz de proporcionar efeito positivo ao diminuir níveis da proteína pro apoptótica e aumentar Bcl-2, proteína antiapoptótica. De maneira geral, IDA foi capaz de bloquear os efeitos da DEX, exceto nos níveis de Bcl-2 na amígdala. Notavelmente os níveis destas proteínas estavam divergentes significativamente apenas em 24 horas. Em 10 e 30 dias, havia pouco ou nenhuma diferença significativa em todas as estruturas avaliadas.

Apesar da grande maioria dos anestésicos estarem associados a neurodegeneração, principalmente quando cérebros em desenvolvimento são expostos a tais medicamentos, e como consequência, acabam levando a danos neurológicos na vida adulta (Disma et al., 2016), a DEX além de proporcionar a neuroproteção através da regulação de vias apoptóticas também é responsável por promover uma melhora na memória e aprendizagem espacial, através da promoção da neurogênese e plasticidade sináptica, por meio da expressão de proteínas associadas a sinapse, como por exemplo, PSD-95 (Zhang et al., 2019). Além do mais, em um modelo de sepse induzido por CLP, Moraes et al (2017) demonstraram que após 24h de cirurgia, os animais sépticos apresentavam redução no número de sinapses excitatórias identificadas pela marcação da proteína sinaptofisina/PSD-95, sendo que esta perda foi acompanhada por neuroinflamação, através da ativação de células da microglia e aumento na concentração de IL- β no hipocampo.

Sendo assim, foram dosados níveis desta proteína (PSD-95), 24 horas, 10 e 30 dias após tratamentos, em pré-frontal, amígdala e hipocampo. Em 24 horas após tratamentos, o grupo que recebeu DEX foi capaz de aumentar esta proteína atrelada a plasticidade sináptica, PSD-95, quando comparada ao grupo sepse sem tratamento, em pré-frontal. Já o grupo que recebeu apenas IDA, apresentou níveis desta proteína diminuídos em relação a DEX, também em pré-frontal. Na amígdala em 24 horas, o nível de PSD-95 no grupo séptico estava diminuído em relação aos animais saudáveis (sham). Em 10 dias não houve qualquer diferença estatística em nenhuma das estruturas. Em 30 dias, apenas na amígdala, ambos os grupos que receberam IDA, tiveram esta proteína diminuída em relação a Sham.

Corroborando com estes dados, um estudo de Lv Hu et al (2021), demonstrou que DEX promove ações neuroprotetoras através da regulação da via HDAC5/ NPAS4/ MDM2/ PSD-95 em modelo de isquemia cerebral. E em estudos com outros anestésicos, como propofol e isofurano, Pang et al (2020) e Xing et al (2020) demonstraram que há redução da expressão

de PSD-95 com a utilização destes medicamentos, bem como aumento na morte neuronal por apoptose em hipocampo, ocasionando redução na memória espacial e habilidades da memória, mas que DEX é capaz de melhorar estes parâmetros através do aumento da expressão de PSD-95.

Aqueles pacientes que sobrevivem a sepse, acabam por desenvolver danos cognitivos, na memória e aprendizagem (Gordon et al., 2008). Como visto anteriorente, a utilização da DEX durante o curso da sepse, apresentou efeitos positivos, como anti-inflamatórios, anti-apoptóticos e também comportamentais. Mas apesar de seus notórios efeitos, a sepse por si só é responsável por uma alta taxa de mortalidade (Vincent et al., 2014), sendo que a prevalência da sepse no Brasil chega a 30% e a taxa de mortalidade intra-hospitalar chega a 55%, sendo a principal causa de morte em UTI's não cardíacas (ILAS, 2015).

Desta maneira, foi acompanhado a taxa de sobrevivência dos animais (n=10/por grupo), durante 10 dias. Como esperado, a maior taxa de sobrevivência foi a do grupo Sham (90%) e a menor do grupo CLP sem tratamento, cerca de 50%. Dentre os grupos sépticos que receberam tratamentos a mortalidade foi de 55% para o grupo que recebeu somente IDA e de 60% para os dois grupos que receberam DEX (CLP+DEX e CLP+IDA+DEX). Apesar de DEX ter aumentado a taxa sobrevivência em 10%, quando comparado ao grupo CLP sem tratamento, o resultado não foi significativo estatisticamente. A diferença estatística se deu apenas entre o grupo Sham, que apresentou a maior taxa de sobrevivência, em relação aos demais grupos sépticos.

De acordo com Kawazoe et al., (2017), em um estudo com pacientes sépticos, que estavam sob ventilação mecânica, a mortalidade foi acompanhada durante 28 dias, onde a incidência de morte foi de 22,8% para aqueles pacientes que utilizavam DEX e de 30,8% para aqueles que não a utilizavam. Apesar da DEX não demonstrar estatisticamente uma melhora na mortalidade, os pacientes que a utilizaram foram capazes de demonstrar uma melhor comunicação, redução de *delirium* e sedação mais controlada em relação a outros medicamentos. Conforme uma revisão sistemática e metáanálise realizada por Chen et (2020), onde quatro estudos, com total de 349 pacientes, foram inclusos, a administração de DEX como sedativo para pacientes sépticos não foi associada à duração de ventilação mecânica, porém aumentou os dias livres de ventilação e levou a uma redução da mortalidade em 28 dias.

7 CONCLUSÃO

A sepse é uma doença que sabidamente apresenta exacerbação da resposta inflamatória, com aumento de citocinas como IL-6, IL-1 β , TNF- α , ativação microglial, aumento de glutamato cerebral e desbalanço de proteínas relacionadas a apoptose. Além de apresentar altos índices de mortalidade e gastos hospitalares, aqueles pacientes que sobrevivem, acabam desenvolvendo danos cognitivos, na aprendizagem e memória. Neste presente trabalho, foi utilizado a dexmedetomidina, um agonista do receptor α 2-adrenérgico, que atua como fármaco sedativo e vem apresentando efeitos benéficos, como anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores. Podemos demonstrar através de experimentos, utilizando tratamentos com dexmedetomidina e/ou idazoxan (antagonista dos receptores α 2-adrenérgicos), tanto durante o desenvolvimento da sepse, quanto com o tratamento tardio (15 dias após o início da sepse), que a DEX foi protetora, causando diminuição de citocinas pró-inflamatórias, redução da ativação microglial, promovendo o balanço de proteínas pro e anti-apoptóticas, modulação de glutamato e principalmente preservando a memória de aprendizado. Já o IDA, utilizado para antagonizar os efeitos da DEX, demonstrou apresentar antagonismo apenas parcialmente, conseguindo bloquear efeitos da DEX apenas em algumas tarefas relacionadas a memória e em alguns parâmetros avaliados.

REFERÊNCIAS

- Adhikari N. Residents' work schedule and patient safety. *JNMA J Nepal Med Assoc.* 2010; 50(180):328-31.
- Agrawal J, Ludwig B, Roy B, Dwivedi Y. Chronic Testosterone Increases Impulsivity and Influences the Transcriptional Activity of the Alpha-2A Adrenergic Receptor Signaling Pathway in Rat Brain. *Molecular Neurobiology* 2019; 56: 4061–4071.
- Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol*, 1948;153:586-60.
- Alves-Filho, J. C. et al. The role neutrophils in severe sepsis. *Shock* 2008;1: 3-9.
- Andrade, S. F. Estudo clínico e laboratorial da intoxicação experimental por amitraz em gatos e comparação entre ioimbina e atipamezole como tratamento. 2004. 175f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina e Zootecnia Veterinária, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2004.
- Angus, D.C.; Linde-zwirble W. T. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. *Critical Care* 2004; 8:222-226.
- 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. *Crit Care Med* 2001; 29:1303-10.
- Angus DC, Van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2013; 21; 369(21):2063.
- Anrather J, Gallo EF, Kawano T, Orio M, Abe T, Gooden C, Zhou P, Iadecola C. Purinergic signaling induces cyclooxygenase-1-dependent prostanoid synthesis in microglia: roles in the outcome of excitotoxic brain injury. *PLoS One.* 2011;6(10):e25916.
- Attwell D. Brain Uptake of Glutamate: Food for Thought, *The Journal of Nutrition*, Volume 130, Issue 4, April 2000, Pages 1023S–1025S.
- Bagatini A, Gomes CR, Masella MZ, Rezer G. Dexmedetomidine: Pharmacology and Clinical Application. *Rev Bras Anesthesiol* 2002; 52: 5: 606 – 617.
- Baumgarten, G. et al. In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. *J Infect Dis* 2001;183:1617-24.
- Barochia AV, Cui X, Vitberg D, Suffredini AF, O’Grady NP, Banks SM, et al. Bundled care for septic shock: an analysis of clinical trials. *Crit Care Med.* 2010;38(2):668-78.

Bell MT, Puskas F, Bennett DT, Herson PS, Quillinan N, Fullerton DA, Reece TB. Bell Dexmedetomidine, an α -2a adrenergic agonist, promotes ischemic tolerance in a murine model of spinal cord ischemia-reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014;147:500-7.

Bell MT, Phillip DFD, Smith VA, Agoston DA, Fullerton X. Attenuation of spinal cord ischemia-reperfusion injury by specific α -2a receptor activation with dexmedetomidine. *Journal of vascular surgery* 2012; 56: 5.

Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(6):933-940.

Bhana N, Goa KL, McClellan KJ. Dexmedetomidine. *Drugs* 2000; 59: 263-268; discussion 269-270.

Bickler P.E., B.M. Hansen, α -2-adrenergic agonists reduce glutamate release and glutamate receptor mediated calcium changes in hippocampal slices during hypoxia, *Neuropharmacology* 35 (1996) 679–687.

Biff D, Petronilho F, Constantino. Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. *Shock* 2013; 40:45–48.

Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; 232: 331-56.

Boomer, Jonathan S; Green, Jonathan M; Hotchkiss, Richard S. The changing immune system in sepsis. *Virulence*, 2014; 5(1), 45–56.

Braun-fahrlander, C. et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *The New England Journal of Medicine* 2002;347,869-77.

Brooks HF, Osabutey CK, Moss RF, Andrews PL, Davies DC. Cecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. *Metab Brain Dis* 2007; 22:353-73.

Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P et al - EPiSEPSiS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *intensive Care Med*, 2004;30:580-588.

Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, Lipton SA. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:6161– 6166.

Bulow, Neusa Maria Heinzmann, et al. Inflammatory Response in Patients under Coronary Artery Bypass Grafting Surgery and Clinical Implications: A Review of the Relevance of Dexmedetomidine Use. 2014.

Burbulys D, Kiai K. α -adrenergic analgesics, dexmedetomidine. The essence of analgesia and analgesics. New York: Cambridge University Press 2011; 83: 335–8.

Bylund, D.B. Subtypes of α - and β -adrenergic receptors, *FASEB J* 1992; 6: 832–839.

Callera GE, Yeh E, Tostes RC, Caperuto LC, Carvalho CR, Bendhack LM. Changes in the vascular beta-adrenoceptor-activated signalling pathway in 2Kidney-1Clip hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2004;141(7):1151-1158.

Carollo DS, Nossaman BD, Ramadhyani U. Dexmedetomidine: a review of clinical applications. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2008;21:457–61.

Chang HJ, Lynn C, Glass RM. Sepsis. *JAMA* 2010;304:1856.

Chen, J. F.; Eltzhig, H. K.; Fredholm, B.B. Adenosine receptors as drug targets - what are the challenges? *Nature Reviews*, 2013; 12:273-295.

Chen, P., Jiang, J., Zhang, Y., Li, G., Qiu, Z., Levy, M. M., & Hu, B. (2020). Effect of Dexmedetomidine on duration of mechanical ventilation in septic patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC pulmonary medicine*, 20(1), 42.

Chen R, Mukhin YV, Garnovskaya MN, Thielen TE, Iijima Y, Huang C, Raymond JR, Ullian ME, Paul RV. A functional angiotensin II receptor-GFP fusion protein: evidence for agonist-dependent nuclear translocation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279:440–448.

Chen Y, Feng X, Hu X, Sha J, Li B, Zhang H, Fan H. Dexmedetomidine Ameliorates Acute Stress-Induced Kidney Injury by Attenuating Oxidative Stress and Apoptosis through Inhibition of the ROS/JNK Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Sep 3;2018:4035310.

Chen Y, Miao L, Yao Y, Wu W, Wu X, Gong C, Qiu L, Chen J. Dexmedetomidine Ameliorate CLP-Induced Rat Intestinal Injury via Inhibition of Inflammation. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 918361.

Chen, J., Yan, J., Han, X., Dexmedetomidine may benefit cognitive function after laparoscopic cholecystectomy in elderly patients. *Exp. Ther. Med.* 2012; 5(2), 489–494.

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

Collodel AM. Inibidor de rage previne disfunção cognitiva e reduz mediadores inflamatórios em um modelo experimental de meningite pneumocócica [dissertação de mestrado]. Programa de pós graduação em ciências da saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2017.

Colucci WS, Braunwald E: Adrenergic receptors: New concepts and implications. *Cardiovasc Clin* 1984; 14: 39.

Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LS et al. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res* 2011;36:304–311.

Cotena S, Piazza O. Sepsis-associated encephalopathy. *Translational Medicine @ UniSa*; 2012, 2(3): 20-27.

Coull J T. Pharmacological manipulations of the alpha 2-noradrenergic system. Effects on cognition. *Drugs Aging*. 1994;5(2):116-26.

Coursin, D.B., Coursin, D.B., Maccioli, G.A., . Dexmedetomidine. *Curr. Opin. Crit. Care* 2001; 7 (4), 221–226.

Da Fonseca AC, Matias D, Garcia C et al .The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci* 2014; 8:362.

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

Danbolt NC. Glutamate uptake, *Progress in Neurobiology*. 2001, 65:1: 1-105.

De Benedetto GE, Fico D, Pennetta A, Malitesta C, Nicolardi G, Lofrumento DD, De Nuccio F, La Pesa V. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014; 98: 266–270.

Denes A.,Thornton P,Rothwell N.J., .Allan S.M. Inflammation and brain injury: Acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity* 2010; 24 (5):708-723.

De Lima MNM, Presti-Torres J, Caldana F, Grazziotin MM, Scalco FS, Guimaraes MR, Bromberg E, Franke SIR, Henriques JAP and Schröder N. Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 570: 111-114.

Dean JM, Gunn AJ, Wassink G, George S, Bennet L. Endogenous alpha2-adrenergic receptor-mediated neuroprotection after severe hypoxia in preterm fetal sheep. *Neuroscience*. 2006;142(3):615-628.

Dean JM, George S, Naylor AS, Mallard C, Gunn AJ, Bennet L. Partial neuroprotection with low-dose infusion of the alpha2-adrenergic receptor agonist clonidine after severe hypoxia in preterm fetal sheep. *Neuropharmacology* 2008;55:166-74.

Degos V, Charpentier TL, Chhor V, Brissaud O, Lebon S, Schwendimann L, Bednareck N, Passemard S, Mantz J, GressensP. Neuroprotective effects of dexmedetomidine against glutamate agonist-induced neuronal cell death are related to increased astrocyte brain-derived neurotrophic factor expression. *Anesthesiology*. 2013;118:1123–32.

Delanty, N.; Dichter, M. A. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand.* v.98, p. 145-53, Set. 1998.

Dick JB, Shafer SL - Dexmedetomidine pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Anaesth Pharm Review*, 1993;1:238-245.

Disma N, Mondardini MC, Terrando N, Absalom AR, Bilotta F. A systematic review of methodology applied during preclinical anesthetic neurotoxicity studies: important issues and lessons relevant to the design of future clinical research. *Paediatr Anaesth.* 2016 Jan;26(1):6-36.

Dong Y., Kalueff ,A; Song C. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium overload and endoplasmic reticulum stress are involved in interleukin-1beta-induced neuronal apoptosis in rat hippocampus. *Journal of Neuroimmunology* 2017; 307:7-13.

Duan X, Coburn M, Rossaint R, Sanders RD, Waesberghe JV, Kowark A. Efficacy of perioperative dexmedetomidine on postoperative delirium: systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis of randomised controlled trials. *Br J Anaesth.* 2018 Aug;121(2):384-397.

Dutta S, Karol M.D, Cohen T, Jones R.M, Mant T. Effect of dexmedetomidine on propofol requirements in healthy subjects, *J. Pharm. Sci.* 90 (2) (2001) 172– 181.

Dyck JB, Shafer SL - Dexmedetomidine pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Stanford Univers School of Medicine*, 2000;1:1-5.

Ebert TJ, Hall JE, Barney JA, et al. The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans. *Anesthesiology.* 2000;93(2):382–94.

Eldridge, Matthew JG; Shenoy, Avinash R . Antimicrobial inflammasomes: unified signalling against diverse bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 2015; 23: 32–41.

Engelhard K, Werner C, Eberspa E, Bachl M, Blobner M, Hildt E, et al. The effect of the α_2 -agonist dexmedetomidine and the N-methyl-D aspartate antagonist S(+) ketamine on the expression of apoptosis-regulating Proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Neurosurg Anesth* 2003;96:524-31.

Ferraz, E. et al. Toll-Like Receptors: regulation of the immune responses. *RGO - Rev Gaúcha Odontologia*, Porto Alegre, 2011; 9:483-490.

Ferrer R, Artigas A, Levy MM, Blanco J, González-Díaz G, Garnacho-Montero J, Ibáñez J, Palencia E, Quintana M, de la Torre-Prados MV; Edusepsis Study Group. Improvement in process of care and outcome after a multicenter severe sepsis educational program in Spain. *JAMA.* 2008;299(19):2294-303.

Flamez A, De Backer JP, Czerwiec E, Ladure P, Vauquelin G. Pharmacological characterization of I1 and I2 imidazoline receptors in human striatum. *Neurochem Int* 1997;30:25–29.

Franks NP, Lieb WR: Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 1994; 367:607–14.

Frohlich ED. Methyldopa: mechanisms and treatment 25 years later. *Arch Intern Med* 1980;140:954.

Generoso, J. Tratamento com vitamina B6 e B9 na prevenção de dano oxidativo e cognitivo em Meningite Pneumocócica Experimental. 2017. 122f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2017.

Gehring, U. et al. House dust endotoxin and allergic sensitization in children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002; 166: 939-44.

Giulian D, Woodward J, Young DG et al. Interleukin-1 injection into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci* 1988;8:2485–2490.

Girard TD, Jackson JC, Pandharipande PP, Pun BT, Thompson JL, Shintani AK et al. Delirium as a predictor of long-term cognitive impairment in survivors of critical illness. *Crit Care Med*, 2010; 38(7):1513-20.

Goldberg M.P, Choi D.W. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury, *J. Neurosci.* 13 (1993) 3510–3524

Goldman, M. Translational Mini-Review Series on Toll-like Receptors: Toll-like receptor ligands as novel pharmaceuticals for allergic disorders. *Clin Exp immunol.* 2007;147:208-16.

Gomez-Mancilla B, Bédard PJ. Effects of nondopaminergic drugs on L-dopa-induced dyskinesias in MPTP-treated monkeys. *Clin Neuropharmacol* 1993; 16:418–427.

Görnemann T, Jähnichen S, Schurad B, et al. Pharmacological properties of a wide array of ergolines at functional alpha(1)-adrenoceptor subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008;376(5):321-330.

Goodwin HE, Gill RS, Murakami PN, et al. Dexmedetomidine preserves attention/calculation when used for cooperative and short-term intensive care unit sedation. *J Crit Care.*2013;28(6): 1113e7–e10.

Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3, 23–35.

Gordon SM, Jackson JC, Ely EW, Burger C, Hopkins RO. Clinical identification of cognitive impairment in ICU survivors: insights for intensivists. *Intensive Care Med.* 2004;30:1997–2008.

Goshen I, Yirmiya R. (2009). Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 30–45 [Epub ahead of print].10.1016/j.yfrne.2008.10.001.

Goyagi T. Dexmedetomidine reduced sevoflurane-induced neurodegeneration and long-term memory deficits in neonatal rats. *Int J Dev Neurosci.* 2019 Jun;75:19-26. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2019.04.002. Epub 2019 Apr 5. PMID: 30959098.

Guo Y, Sun L, Zhang J, Li Q, Jiang H, Jiang W. Preventive effects of low-dose dexmedetomidine on postoperative cognitive function and recovery quality in elderly oral cancer patients. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:16183–90.

Gustafson I, Westerberg E, Wieloch T. 1990. Protection against ischemia-induced neuronal damage by the alpha 2-adrenoceptor antagonist idazoxan: Influence of time of administration and possible mechanisms of action. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1088S94

Hall JE, Uhrich TD, Barney JA et al - Sedative, amnesic, and analgesic properties of small-dose dexmedetomidine infusions. *Anesth Analg.* 2000;90:699-705.

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.

Halliwell, B; Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford, UK: Clarendon Press 2007; 4.

Hayashi Y, Maze M - Alpha-2 adrenoreceptor agonist and anesthesia. *Br J Anaesth.* 1993;71:108-118.

Hofer S, Stepan J, Wagner T, Funke B, Lichten-stern C, Martin E, et al. Central sympatholytics prolong survival in experimental sepsis. *Critical care.* 2009; 13(1):R11.

Hollenberg SM, Broussard M, Osman J, Parrillo JE. Increased Microvascular Reactivity and Improved Mortality in Septic Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase. *Circ Res.* 2001; 86:774-778.

Hopkins RO, Weaver LK, Collingridge D, Parkinson RB, Chan KJ, Orme Jr. Two year cognitive, emotional, and quality-of-life outcomes in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2005; 21:98–103.

Hotchkiss, R. S., K. C. Chang, P. E. Swanson, K. W. Tinsley, J. J. Hui, P. Klender, S. Xanthoudakis, S. Roy, C. Black, E. Grimm, et al. 2000. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat. Immunol.* 1:496.

Hoy SM, Keating GM. Dexmedetomidine: a review of its use for sedation in mechanically ventilated patients in an intensive care setting and for procedural sedation. *Drugs*. 2011;71: 1481–501.

Huang Y, Stamer DW, Anthony TL, Kumar DV, St. John PA, Regan JW. Expression of α -adrenergic receptor subtypes in prenatal rat spinal cord 2002; 133: 93–104.

Hwang L, Ko IG, Jin JJ, Kim SH, Kim CJ, Chang B, et al. Dexmedetomidine ameliorates memory impairment in sleep-deprived mice. *Anim Cells Syst (Seoul)*. 2019;23(6):371-9.
Ikeda KC, Higashio H, Nakano M, Okubo M, Satoh Y, Kurosaka D, Saino T. α 1-Adrenoceptors relate Ca^{2+} modulation and protein secretions in rat lacrimal gland. *Biomedical Research* 2015; 36 (6) 357–369.

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 1998;393(6686):635-636.

Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 2010; 304(16):1787–1794.

Janeway CA, Travers P. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science. 8th edition, 2014.

Janke E. L and Samra S. Dexmedetomidine and neuroprotection. *Seminars in Anesthesia Perioperative Medicine and Pain* 2006; 25:71–76.

Jeohn GH, Kong LY, Wilson B et al. Synergistic neurotoxic effects of combined treatments with cytokines in murine primary mixed neuron/glia cultures. *J Neuroimmunol* 1998;85:1–10.

Ji D, Zhou Y, Li S, Li D, Chen H, Xiong Y, Zhang Y, Xu H. Anti-nociceptive effect of dexmedetomidine in a rat model of monoarthritis via suppression of the TLR4/NF- κ B p65 pathway. *Exp Ther Med*. 2017 Nov;14(5):4910-4918.

Jiang L, Li L, Shen J, Qi Z, Guo L. Effect of dexmedetomidine on lung ischemia-reperfusion injury. *Mol Med Rep*. 2014;9(2):419-426.

Kallio I.J, Kujala, H.A. Peripherally acting α -adrenoceptor antagonist MK-467 with intramuscular medetomidine and butorphanol in dogs: A prospective, randomised, clinical trial. *The Veterinary Journal*. 2018; 240, 22-26.

Kamibayashi T, Maze M. Clinical uses of α 2-adrenergic agonists. *Anesthesiology*. 2000 ;93(5):1345-9.

Karima, R.; Matsumoto, S.; Higashi, H.; Matsushima, K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Molecular Medicine Today*, 1999; 5:123–3.

Kaur M, Singh PM. Current role of dexmedetomidine in clinical anesthesia and intensive care. *Anesth Essays Res* 2011;5(2):128–33.

Kauss, I.A.M. et al. The epidemiology of sepsis in a Brazilian teaching hospital. *Braz J Infect Dis*. 2010; 14: 264-270.

Kawai, T; Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010; 11: 373-84.

Kawasaki T, Kawasaki C, Ueki M, Hamada K, Habe K, Sata T. Dexmedetomidine suppresses proinflammatory mediator production in human whole blood in vitro. *J Trauma Acute Care Surg.* 2013 May;74(5):1370-5.

Kawazoe Y, Miyamoto K, Morimoto T, Yamamoto T, Fuke A, Hashimoto A, Koami H, Beppu S, Katayama Y, Itoh M, Ohta Y, Yamamura H; Dexmedetomidine for Sepsis in Intensive Care Unit Randomized Evaluation (DESIRE) Trial Investigators. Effect of Dexmedetomidine on Mortality and Ventilator-Free Days in Patients Requiring Mechanical Ventilation With Sepsis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2017 Apr 4;317(13):1321-1328.

Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997 Feb 21;275(5303):1132-6.

Knuefermann, P. et al. Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll-like receptors? *Chest.* 2002; 121: 1329-36.

Kong W, Kang K, Gao Y, et al. Dexmedetomidine alleviates LPS-induced septic cardiomyopathy via the cholinergic anti-inflammatory pathway in mice. *Am J Transl Res.* 2017;9(11):5040-5047.

Krebs, V. L. J. et al . Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of newborn with meningitis. *Arq. Neuro-Psiquiatr* 2005; 63: 7-13.

Kurtz, PMP. Encefalopatia Associada a Sepse: Fisiopatologia Na Sepse Experimental Com Avaliação Por Monitorização Multimodal E Estudo Observacional Na Sepse Clínica (estudo SAE). 2016.

Kurtz, P; d'Avila, JC.; Prado, D; Madeira, C; Vargas-Lopes, C; Panizzutti, R; Azevedo, LC.P.; Bozza, FA. Cerebral Multimodal Monitoring in Sepsis: An Experimental Study, SHOCK: February 2019; 51(2): 228-234.

Lamar CD, Hurley RA, Hayman LA, Taber KH . Sepsis-associated encephalopathy: review of the neuropsychiatric manifestations and cognitive outcome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci:* 2011; 3–23 11.

Li Y, Zeng M, Chen W, Liu C, Wang F, Han X, Zuo Z, Peng S. Dexmedetomidine reduces isoflurane-induced neuroapoptosis partly by preserving PI3K/Akt pathway in the hippocampus of neonatal rats. *PLoS One.* 2014;9:e93639.

Li P, Shen T, Luo X, Yang J, Luo Z, Tan Y, He G, Wang Z, Yu X, Wang Y, Yang X. Modulation of microglial phenotypes by dexmedetomidine through TREM2 reduces neuroinflammation in heatstroke. *Sci Rep.* 2021 Jun 25;11(1):13345.

- Li, H., Zhang, X., Chen, M., Chen, J., Gao, T., Yao, S., 2018. Dexmedetomidine inhibits inflammation in microglia cells under stimulation of LPS and ATP by c-Fos/NLRP3/ caspase-1 cascades. *EXCLI J.* 17, 302–311.
- Liao Z, Cao D, Han X, et al. Both JNK and P38 MAPK pathways participate in the protection by dexmedetomidine against isoflurane-induced neuroapoptosis in the hippocampus of neonatal rats. *Brain Res Bull.* 2014;107:69–78.
- Lima IF, Rodrigues RB, Silva YP. Dexmedetomidina: aplicações em pediatria e potencial efeito neuroprotetor em neonatos. *Revista Med Minas Gerais* 2011; 21:27-37.
- Limbird, LE. Receptors linked to the inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. *FASEB J* 1988; 2 (11): 2686-2695.
- Lipton Y, Reed AS. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell* 2004;15:355-366.
- Liu MC, Liu XQ, Wang W, Shen XF, Che HL, Guo YY, et al. Involvement of microglia activation in the lead induced long-term potentiation impairment. *PLoS One.* 2012;7(8):e43924.
- Liu Y, Ma L, Gao M, Guo W, Ma Y. Dexmedetomidine reduces postoperative delirium after joint replacement in elderly patients with mild cognitive impairment. *Aging Clin Exp Res.* 2016;28:729–36.
- Luchs A., Pantaleão, C. Apoptosis and in vivo models to study the molecules related to this phenomenon. *Einstein.* 2010; 8(4 Pt 1):495-7.
- Luo T, Wu WH, Chen BS. NMDA receptor signaling: death or survival?. *Front Biol (Beijing).* 2011;6(6):468-476.
- Lv H, Li Y, Cheng Q, Chen J, Chen W. Neuroprotective Effects Against Cerebral Ischemic Injury Exerted by Dexmedetomidine via the HDAC5/NPAS4/MDM2/PSD-95 Axis. *Mol Neurobiol.* 2021 May;58(5):1990-2004.
- Lynch M. A. Age-related neuroinflammatory changes negatively impact on neuronal function. *Front. Aging Neurosci* 2010; 1: 6.
- Ma, D., Hossain, M., Rajakumaraswamy, N., Arshad, M., Sanders, R.D., Franks, N.P., et al. Dexmedetomidine produces its neuroprotective effect via the alpha 2A-adrenoceptor subtype. *J Pharmacol Eur. J. Pharmacol* 2004a; 502 (1–2), 87–97.
- MacDonald, E. and Scheinin, M. Distribution and pharmacology of alpha 2-adrenoceptors in the central nervous system. *J. Physiol. Pharmacol* 1995; 46, 241–258.
- Maiese K, Pek L, Berger SB, Reis DJ. 1992. Reduction in focal cerebral ischemia by agents acting at imidazole receptors. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12:53-63

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. Epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 2003; 348:1546-1554.

McNamee, E.N., Griffin, É.W., Ryan, K.M., Ryan, K.J., Heffernan, S., Harkin, A., Connor, T.J. Noradrenaline acting at b-adrenoceptors induces expression of IL-1b and its negative regulators IL-1ra and IL-1RII, and drives an overall antiinflammatory phenotype in rat cortex. *Neuropharmacology* 2010b; 59, 37–48.

Mei B, Li J, Zuo Z. Dexmedetomidine attenuates sepsis-associated inflammation and encephalopathy via central α 2A adrenoceptor. *Brain Behav Immun*. 2021 Jan;91:296-314. doi: 10.1016/j.bbi.2020.10.008. Epub 2020 Oct 8. PMID: 33039659; PMCID: PMC7749843.

Memis, D, Hekimoğlu S, Vatan I, Yandım T, Yüksel M, Süt N. Effects of midazolam and dexmedetomidine on inflammatory responses and gastric intramucosal pH to sepsis, in critically ill patients. *Br J Anaesth*. 2007;98:550–2.

Meneghini V, Bortolotto V, Francese MT, Dellarole A, Carraro L, Terzieva S et al. High - mobility group box -1 protein and beta-amyloid oligomers promote neuronal differentiation of adult hippocampal neural progenitors via receptor for advanced glycation end products/nuclear factor-kappaB axis: relevance for Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2013; 33(14):6047-59.

Michels M, Sonai B, Dal-Pizzol F. Polarization of microglia and its role in bacterial sepsis. *J Neuroimmunol*. 2017; 15: 303:90-98.

Michels, M. et al. Neuroinflammation: microglial activation during sepsis. *Current Neuvascular Research* 2014; 11:262-70.

Michels M, Abatti MR, Ávila P, Vieira A, Borges H, Carvalho Junior C, Wendhausen D, Gasparotto J, Tiefensee Ribeiro C, Moreira JCF, Gelain DP, Dal-Pizzol F. Characterization and modulation of microglial phenotypes in an animal model of severe sepsis. *J Cell Mol Med*. 2020 Jan;24(1):88-97.

Mina F, Comim CM, Domingui D et al. Il1- β involvement in cognitive impairment after sepsis. *Mol Neurobiol* 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.

Mirski MA, Lewin JJ, LeDroux S, et al. Cognitive improvement during continuous sedation in critically ill, awake and responsive patients: the Acute Neurological ICU Sedation Trial (ANIST). *Intensive Care Med*. 2010;36(9):1505–13.

Moraes, C. Investigação do papel da microglia na disfunção sináptica na sepse. 2017. 121 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)-Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

- Moore A. H., Wu M., Shaftel S. S., Graham K. A., O'Banion M. K. (2009). Sustained expression of interleukin-1 β in mouse hippocampus impairs spatial memory. *Neuroscience* 164, 1484–1495. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.073
- Moreno, R. Incidence of sepsis in hospitalized patients. *Current Infectious Disease Reports* 2006; 8:346-350.
- Nelson LE, Lu J, Guo T, Saper CB, Franks NP, Maze M. The alpha2-adrenoceptor agonist dexmedetomidine converges on an endogenous sleep-promoting pathway to exert its sedative effects. *Anesthesiology*. 2003;98(2):428-436.
- Nemni R, Iannaccone S, Quattrini A et al. Effect of chronic treatment with recombinant interleukin-2 on the central nervous system of adult and old mice. *Brain Res* 1992;591:248–252.
- Newman-Tancredi, A., Nicolas, JP., Audinot, V. *et al.* Actions of α 2 adrenoceptor ligands at α 2A and 5-HT1A receptors: the antagonist, atipamezole, and the agonist, dexmedetomidine, are highly selective for α 2A adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **358**, 197–206 (1998).
- Nguyen Viet, Dawn Tiemann, Edward Park, Ali Salehi. Alpha-2 Agonists. *Anesthesiology Clin* 2017; 17:1932-2275.
- Norden DM, Godbout JP. Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013;39:19–34.
- Ong ML, Ball SG, Vaughn PFT. Regulation of noradrenaline release from rat occipital cortex tissue slices by alpha-2- adrenergic agents. *J Neurochem* 1991; 56: 1387-93.
- Okamoto S-I, Li Z, Ju C, Schohlzke MN, Matthews E, Cui J, Salvesen GS, Bossy-Wetzler E, Lipton SA. Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3974–3979, 2002.
- Palmieri EM, Menga A, Lebrun A, Hooper DC, Butterfield DA, Mazzone M, Castegna A: Blockade of Glutamine Synthetase Enhances Inflammatory Response in Microglial Cells. *Antioxid Redox Signal* 26:351–363, 2017.
- Pang X, Zhang P, Zhou Y, Zhao J, Liu H (2020) Dexmedetomidine pretreatment attenuates isoflurane-induced neurotoxicity via inhibiting the TLR2/NF-kappaB signaling pathway in neonatal rats. *Exp Mol Pathol* 112:104328.
- Panzer, O., Moitra, V., Sladen, R.N. Pharmacology of sedative-analgesic agents: dexmedetomidine, remifentanyl, ketamine, volatile anesthetics, and the role of peripheral mu antagonists. *Crit. Care Clin* 2009; 25 (3), 451–469.
- Patel T., Gores GJ. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. *Liver Transplant Surg* 1998;4:42-50.

Peng M, Wang YL, Wang CY, Chen C. Dexmedetomidine attenuates lipopolysaccharide-induced proinflammatory response in primary microglia. *J Surg Res*. 2013;179(1):e219-e225.

Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2014;10:217–24.

Perucho J, Gonzalo-Gobernado R, Bazan E, Casarejos MJ, Jiménez-Escrig A, Asensio MJ, Herranz AS. Optimal excitation and emission wavelengths to analyze amino acids and optimize neurotransmitters quantification using precolumn OPA-derivatization by HPLC. *Amino Acids*. 2015; 47: 963-973.

Petroff OA, Errante LD, Rothman DL, Kim JH, Spencer DD. Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus. *Epilepsia*. 2002 Jul;43(7):703-10.

Petronilho F, Périgo SR, Vuolo F. Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 2012; 26:904–910.

Petroz GC, Sikich N, James M. A phase I, two-center study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of dexmedetomidine in children. *Anesthesiology* 2006;105:1098–110.

Petzelt C., Blom P., Schmehl W, Muller J, Kox W.J, Xenon prevents cellular damage in differentiated PC-12 cells exposed to hypoxia, *BMC Neurosci*. 5 (2004) 55.

Philipp M, Brede M, Hein L. Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Aug;283(2):R287-95. doi: 10.1152/ajpregu.00123.2002. PMID: 12121839.

Praticò C, Quattrone D, Lucanto T, et al. Drugs of anesthesia acting on central cholinergic system may cause post-operative cognitive dysfunction and delirium. *Med Hypotheses*. 2005;65(5):972-982.

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(4):e0195873.

Rajakumaraswamy N, Ma D, Sanders RD, et al. Neuroprotective interaction produced by xenon and dexmedetomidine on in vitro and in vivo neuronal injury models. *Neuroscience*. 2006; 409:128-33.

Rangel-Frausto MS. Sepsis: still going strong. *Arch of Med Res*, 2005; 36: 672-681.

Rankin, D.C. Sedatives and tranquilizers In Lumb & Jones' *Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 5 ed. Iowa: Blackwell Scientific Pub, 2015; 86-113.

- Regan W, Cotecchia S. The α -adrenergic receptors: new subtypes, Prevent Blindness Career Development Awardee. pharmacology and coupling mechanisms, in: M.R. Brann (Ed.), *Molecular Biology of G-Protein Coupled Receptors*, Birkhauser, 1992; 76–112.
- Regunathan S, Reis DJ (1996) Imidazoline receptors and their endogenous ligands. *Ann Rev Pharmacol* 36:511–544
- Reinhart, K.; Daniels, R.; Machado, F. R. O ônus da sepse: uma chamada em apoio ao Dia Mundial da Sepse 2013. *Revista Brasileira Terapia Intensiva* 2013; 25; (1)3-5.
- Riker RR, Shehabi Y, Bokesch PM, et al. Dexmedetomidine vs midazolam for sedation of critically ill patients: a randomized trial. *JAMA*. 2009;301(5):489-499.
- Ringer TM, Axer H, Romeike BF, Zinke J, Brumkhorst F, Witte OW, et al. Neurological sequelae of sepsis: I) Septic encephalopathy. *Crit Care Med J*, 2011; 4:2-7.
- Roesler, R., Vianna, M.R., De-paris, F., Quevedo, J. Memory-Enhancing Treatments Do Not Reverse The Impairment of Inhibitory Avoidance Retention Induced by NMDA Receptor Blockade. *Neurobiol Learn Mem*. 1999; 72:252-8.
- Roesler, R., et al. Oxidative damage in brains of mice treated with apomorphine and its oxidized derivative. *Brain Res* 2003; 992 (2)246-51.
- Sahin T, Begeç Z, Toprak Hİ, Polat A, Vardi N, Yücel A, Durmuş M, Ersoy MÖ. The effects of dexmedetomidine on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res*. 2013 Jul;183(1):385-90.
- Sales Júnior, J. A.; David, C. M.; Hatum, R. Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *Revista Brasileira Terapia Intensiva* 2006;18(1) 9-17.
- Salvemini, D; Cuzzocrea, S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(9) 1173-85.
- Sanders RD, Xu J, Shu Y, et al. Dexmedetomidine attenuates isoflurane-induced neurocognitive impairment in neonatal rats. *Anesthesiology*. 2009;110(5):1077-1085.
- Sanders RD, Sun P, Patel S, Li M, Maze M, et al. (2010) Dexmedetomidine provides cortical neuroprotection: impact on anaesthetic-induced neuroapoptosis in the rat developing brain. *Acta Anaesthesiol Scand* 54: 710–716.
- Sankowski R, Mader S, Valdés-Ferrer SI. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2015 Feb 2;9:28.
- Sarichelou et al., Metabotropic glutamate receptors regulate differentiation of embryonic stem cells into GABAergic neurons. *Cell Death and Differentiation* (2008) 15, 700–707.

Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 2000; 78: 3-13.

Schoeler M, Loetscher PD, Rossaint R, et al. Dexmedetomidine is neuroprotective in an in vitro model for traumatic brain injury. *BMC Neurol*. 2012;12:20.

Schwalm MT, Pasquali M, Miguel SP et al. Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. *Mol Neurobiol* 2014; 49:380–385.

Schwartz, D.A., Cook, D.N. Polymorphisms of the Toll-like receptors and human disease. *Clinical Infectious diseases* 2005; 41(7) 403-7.

Scott MC. MD. Defining and Diagnosing Sepsis. *Emergency Medicine Clinics of North America* 2017; 35: 1-9.

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. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013; 188(5):586-92.

Shah H, Shi P , Giani JF, Janjulia T, Bernstein EA, Li Y , Zhao T, Harrison DG, Bernstein KE, Shen XZ. Myeloid Suppressor Cells Accumulate and Regulate Blood Pressure in Hypertension. *Circ Res*. 2015; 23:117(10):858-69.

Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, Angus DC, Rubenfeld GD, Singer M; Sepsis Definitions Task Force. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).

Sharshar T, Hopkinson NS, Orlikowski D, Annane D. Science review: The brain in sepsis--culprit and victim. *Crit Care*, 2005; 9(1):37-44.

Shu S, Pei L, Lu Y. Promising targets of cell death signaling of NR2B receptor subunit in stroke pathogenesis. *Regen Med Res*. 2014;2(1):8.

Silva, E. Sepsis: um problema de todos. *Revista Brasileira Terapia Intensiva* 2011; 23 (2)115-116.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-810.

Singh A, Feng Y, Mahato N, Li J, Wu C, Gong J. Role of high-mobility group box 1 in patients with acute obstructive suppurative cholangitis-induced sepsis. *J Inflamm Res*, 2015; 8:71-7.

Smith AP, Wilson SJ, Glue P, et al. The effects and after effects of the (X2-adrenoceptor antagonist idazoxan on mood, memory and attention in normal volunteers. *J Psychopharmacol* 1992; 6: 376-81.

Sonneville R, Verdonk F, Rauturier C et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann Intensive Care* 2013; 3:15.

Steven S., Mobin D, Roohani S, Kashani F, Münzel T, Daiber A. Time Response of Oxidative/Nitrosative Stress and Inflammation in LPS-Induced Endotoxaemia—A Comparative Study of Mice and Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 2176

Starke K, Borowski E, Endo T. Preferential blockade of presynaptic alpha-receptors by yohimbine. *Eur J Pharmacol* 1975; 279: 53-60.

Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds IJ. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci.* 1998 Sep;1(5):366-73.

Su Z, Xu S, Chen T, Chen J. Dexmedetomidine protects spatial learning and memory ability in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015;16(4):995-1000.

Su X, Meng ZT, Wu XH, et al. Dexmedetomidine for prevention of delirium in elderly patients after non-cardiac surgery: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2016;388(10054):1893-1902.

Svensson TH, Bunney BS, Aghajanian GK. Inhibition of both noradrenergic and serotonergic neurons in brain by the alpha-adrenergic agonist clonidine. *Brain Res* 1975; 92: 291-306.

Ta Na HS, An M, Zhang T, Deni W, Hou L, Jin K. Dexmedetomidine inhibits microglial activation through SNHG14/HMGB1 pathway in spinal cord ischemia-reperfusion injury mice. *Int J Neurosci.* 2022 Jan;132(1):77-88.

Tachibana K, Hashimoto T, Kato R, et al. Neonatal administration with dexmedetomidine does not impair the rat hippocampal synaptic plasticity later in adulthood. *Paediatr Anaesth.* 2012;22(7):713-719.

Talke P, Bickler P.E. Effects of dexmedetomidine on hypoxia-evoked glutamate release and glutamate receptor activity in hippocampal slices, *Anesthesiology* 85 (1996) 551–557.

Tancredi V, Zona C, Velotti F et al. Interleukin-2 suppresses established long-term potentiation and inhibits its induction in the rat hippocampus. *Brain Res* 1990;525:149–151.

Tauber SC, Djukic M, Gossner J, Eiffert H, Brück W, Nau R. Sepsis-associated encephalopathy and septic encephalitis: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2021 Feb;19(2):215-231. doi: 10.1080/14787210.2020.1812384. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32808580.

Tenneti L, D'Emilia DM, Troy CM, Lipton SA. Role of caspases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem* 71:946–959, 1998.

- Thomas DN, Holman RB . A microdialysis study of the regulation of endogenous noradrenaline release in the rat hippocampus. *J Neurochem* 1991;56: 1741–1746.
- Torio CM, Andrews RM. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, Statistical Brief 2013: 16;2011.
- Tseng EE, Brock MV, Lange MS, Troncoso JC, Blue ME, Lowenstein CJ, Johnston MV, Baumgartner WA. Glutamate excitotoxicity mediates neuronal apoptosis after hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 2010 Feb;89(2):440-5
- Valli LG, JA Sobrinho. Mecanismo de ação do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas *Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria.* 2014 Jan/Abr;18(1):58-67.
- Van Griensven M. Cytokines as biomarkers in polytraumatized patients. *Unfallchirurg,* 2014; 117(8):699-702.
- Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K; EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 2009;302(21):2323-9.
- Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, François B, Martin-Loeches I, Lipman J, Reinhart K, Antonelli M, Pickkers P, Njimi H, Jimenez E, Sakr Y; ICON investigators. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med.* 2014 May;2(5):380-6.
- Virtanen R, Savola JM, Saano V et al - Characterization of selectivity, specificity and potency of medetomidine as an alpha2 -adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol,* 1988;150:9-14.
- Walkey AJ, Lagu T, Lindenauer PK. Trends in sepsis and infection sources in the United States. A population-based study. *Ann Am Thorac Soc* 2015;12(2): 216–20.
- Wang XS, ChenYY, Shang XF, Zhu ZG, Chen GQ, Han Z, ShaoB, Yang HM, Xu HQ, Chen JF, Zheng RY. Idazoxan attenuates spinal cord injury by enhanced astrocytic activation and reduced microglial activation in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *BrainRes.* 2009, 198–209.
- Wang X. S, Fang HL, Chena Y, Liang SS, Zhu ZG, Zeng QY, Li J, Xu HQ, Shao B, He JC, Hou ST, Zheng RY. Idazoxan reduces blood–brain barrier damage during experimental autoimmune encephalomyelitis in mouse. *European Journal of Pharmacology* 2014;736:70–76.
- Weng X, Shi W, Zhang X, Du J. Dexmedetomidine attenuates H₂O₂-induced apoptosis of rat cardiomyocytes independently of antioxidant enzyme expression. *Rev Port Cardiol (Engl Ed).* 2021 Apr;40(4):273-281. English, Portuguese. doi: 10.1016/j.repc.2020.07.019. Epub 2021 Mar 11. PMID: 33715922
- Wilson CJ, Finch CE, Cohen HJ. Cytokines and cognition--the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. *J Am Geriatr Soc.* 2002;50(12):2041-2056.

- Wood KA, Angus DC. Pharmacoeconomic implications of new therapies in sepsis. *Pharmacoeconomics*. 2004;22(14):895-906.
- Wu Y, Liu Y, Huang H, et al. Dexmedetomidine inhibits inflammatory reaction in lung tissues of septic rats by suppressing TLR4/NF- κ B pathway. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:562154.
- Xing N, Xing F, Li Y, Li P, Zhang J, Wang D, Zhang W, Yang J (2020) Dexmedetomidine improves propofol-induced neuronal injury in rat hippocampus with the involvement of miR-34a and the PI3K/Akt signaling pathway. *Life Sci* 247:117359.
- Xu, B., Zhang, W.S., Yang, J.L., Lu, N., Deng, X.M., Xu, H., Zhang, Y.Q., 2010. Evidence for suppression of spinal glial activation by dexmedetomidine in a rat model of monoarthritis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37, e158–166.
- Xu Y, Zhang R, Li C, Yin X, Lv C, Wang Y, Zhao W, Zhang X. Dexmedetomidine attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mouse through inhibition of MAPK pathway. *Fund Clin Pharmacol* 2015; 29: 462-471.
- Yamanaka D, Kawano T, Nishigaki A, Aoyama B, Tateiwa H, Shigematsu-Locatelli M, Locatelli F, Yokoyama M. Preventive effects of dexmedetomidine on the development of cognitive dysfunction following systemic inflammation in aged rats. *J Anesth* 2016; 5: 327-329.
- Yang D, Hong JH. Dexmedetomidine Modulates Histamine-induced Ca(2+) Signaling and Pro-inflammatory Cytokine Expression. *Korean J Physiol Pharmacol* 2015; 19: 413-420.
- Yao Y, Hu X, Feng X, Zhao Y, Song M, Wang C, Fan H. Dexmedetomidine alleviates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by inhibiting the NLRP3 inflammasome activation via regulating the TLR4/NOX4/NF- κ B pathway. *J Cell Biochem*. 2019 Oct;120(10):18509-18523.
- Yeh, C.H., Hsieh, L.P., Lin, M.C., Wei, T.S., Lin, H.C., Chang, C.C., Hsing, C.H., 2018. Dexmedetomidine reduces lipopolysaccharide induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *PLoS One* 13, e0191070.
- Yende S, Angus DC. Long-term outcomes from sepsis. *Current Infectious Disease Reports*. 2007;9(5):382-6.
- Yende S, Iwashyna TJ, and Angus DC. Interplay between sepsis and chronic health. *Trends in Molecular Medicine*. 2014;20(4):234-8.
- Ying Yuen VM. Dexmedetomidine: perioperative applications in children. *Pediatr Anesth*. 2010; 20:256-64.

Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin YQ, Tenkova T, Wang H, Labruyere J, Olney JW: Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol* 2005; 146:189–97.

Yuan, F., Fu, H., Sun, K. *et al.* Effect of dexmedetomidine on cerebral ischemia-reperfusion rats by activating mitochondrial ATP-sensitive potassium channel. *Metab Brain Dis* 32, 539–546 (2017).

Zamani MM, Keshavarz-Fathi M, Fakhri-Bafghi MS, Hirbod-Mobarakeh A, Rezaei N, Bahrami A, Nader ND. Survival benefits of dexmedetomidine used for sedating septic patients in intensive care setting: a systematic review. *J Crit Care*. 2016;32:93–100.

Zhang C, Lueptow LM, Zhang HT, O'Donnell JM, Xu Y. The Role of Phosphodiesterase-2 in Psychiatric and Neurodegenerative Disorders. *Adv Neurobiol*. 2017;17:307-347.

Zhang L, Wang Wei, Qiao Qian-Qian, Bu Xue-Shan, Tang Ling-Hua, Jia Yi-Fan et al . Pré-condicionamento com dexmedetomidina protege contra lesão pulmonar em ratos com choque hemorrágico. *Rev. Bras. Anesthesiol*. 2019. Abr; 69(2): 160-167.

Zhang L, Wang X, Ai Y et al. Epidemiological features and risk factors of sepsis-associated encephalopathy in intensive care unit patients: 2008–2011. *Chin Med J* 2012; 125:2008–2011.

Zhang M, Luo H, Xi Z, Rogaeva E. Drug repositioning for diabetes based on 'omics' data mining. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126082.

Zhang W, Yu J, Guo M, Ren B, Tian Y, Hu Q, Xie Q, Xu C, Feng Z. Dexmedetomidine Attenuates Glutamate-Induced Cytotoxicity by Inhibiting the Mitochondrial-Mediated Apoptotic Pathway. *Med Sci Monit*. 2020 May 18;26:e922139.

Zhang X, Wang J, Qian W, et al. Dexmedetomidine inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated microglia by suppression of extracellular signal-regulated kinase. *Neurol Res*. 2015;37(3):238-245.

Zhang X, Li Z, Sun X, Jin F, Liu J, Li J. [Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in attenuation of endotoxin induced delirium with dexmedetomidine in mice]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2016;28(2):127-33.

Zhang Y, Gao Q, Wu Z, Xue H, Liu B, Zhao P (2019) Dexmedetomidine promotes hippocampal neurogenesis and improves spatial learning and memory in neonatal rats. *Drug Des Devel Ther* 13:4439–4449.

Zhang Y, Li M, Cui E, Zhang H, Zhu X, Zhou J, Yan M, Sun J. Dexmedetomidine attenuates sevoflurane-induced neurocognitive impairment through α_2 -adrenoceptors. *Mol Med Rep*. 2021 Jan;23(1):38. doi: 10.3892/mmr.2020.11676. Epub 2020 Nov 12. PMID: 33179100; PMCID: PMC7684862.

Zhong H, Minneman KP. Alpha1-adrenoceptor subtypes. *European Journal of Pharmacology*. 1999;375(1-3):261-276.

Zhou, T.T., Wu, J.R., Chen, Z.Y., Liu, Z.X., Miao, B., 2014. Effects of dexmedetomidine on P2X4Rs, p38-MAPK and BDNF in spinal microglia in rats with spared nerve injury. *Brain Res.* 1568, 21–30.

Zhu YJ, Peng K, Meng XW, Ji FH. Attenuation of neuroinflammation by dexmedetomidine is associated with activation of a cholinergic anti-inflammatory pathway in a rat tibial fracture model. *Brain Res.* 2016 Aug 1;1644:1-8.

Ziaja, M. Sepsis and septicencephalopathy: characteristics and experimental models. *Folia Neuropathol* 2012; 50(3)231-9.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer aprovado no Comitê de ética no uso de animais (2018/1)



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 **09/10/2018**.

Título do projeto	Efeitos da dexmedetomidina sobre alterações cognitivas e neuroquímicas tardias induzidas pela sepse
Project title	Effects of dexmedetomidine on sepsis-induced long-term cognitive and neurochemistry alterations
Número do protocolo Protocol number	031/2018-1– Versão 05
Pesquisador principal Principal Investigator	Felipe Dal-Pizzol
Pesquisadores Researchers	Mariane Abatti, Andriele da Silva Vieira.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/11/2018 a 10/11/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/ Wistar
No de animais	580
Idade/Peso	2 meses / 200-300 g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério da 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 S. Valvassori
Samira da Silva Valvassori
 Coordenadora do CEUA

Criciúma, 09 de outubro de 2018.

ANEXO B – Parecer aprovado no Comitê de ética no uso de animais (2020/1)



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



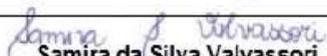
CERTIFICADO

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** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **28/04/2020**.

Título do projeto	O papel da dexmedetomidina em reduzir alterações cognitivas e neuroquímicas ocasionadas pela sepse
Project title	The role of dexmedetomidine on sepsis-induced long-term cognitive and neurochemistry alterations
Número do protocolo Protocol number	23/2020
Pesquisador principal Principal Investigator	Felipe Dal-Pizzol
Pesquisadores Researchers	Mariane Rocha Abatti, Andriele da Silva Vieira, Emily Córneo, Monique Michels, Amanda Indalécio Goulart, Diogo Domingui, Filipe Fernandes Gabriel, Rodrigo Dias.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/06/2020 a 10/06/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	2 meses / 200-300g
Número de animais	Masculino = 324
Procedência	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-SC, 28 de abril de 2020.

ANEXO C – Quadro com resumo dos resultados, etapa I, 24 horas.

Quadro 1 – Resumo dos resultados obtidos na etapa I dos experimentos, **24 horas** após tratamentos: Expressão dos receptores, inflamação cerebral e sistêmica, ativação microglial, quantificação de glutamato, níveis proteicos de BAX, Bcl-2 e PSD-95.

Grupos	Sham	CLP	CLP+DEX	CLP+IDA	CLP+IDA+DEX
Análises					
Expressão dos receptores – pré-frontal					
α -2a	NS	NS	NS	NS	NS
α -2c	NS	NS	NS	NS	NS
Expressão dos receptores – amígdala					
α -2a	NS	NS	NS	NS	NS
α -2c	NS	NS	NS	NS	NS
Expressão dos receptores – hipocampo					
α -2a	NS	NS	NS	NS	NS
α -2c	NS	NS	NS	NS	NS
Inflamação sistêmica					
IL-6	NS	↑*	↓#	↓#	NS
IL-1 β	NS	↑*	NS ↓#p=0,082	NS	↓#
1L-10	NS	NS	NS ↑#p=0,067	↓\$	↓\$
Inflamação cerebral- pré-frontal					
IL-6	NS	↑*	NS ↓#p=0,068	NS	↑*\$
IL-1 β	NS	↑*	↓#	↑*\$	↑*
1L-10	NS	NS	↑*#	NS	NS ↓\$p=0,086
Inflamação cerebral- amígdala					
IL-6	NS	NS	NS	NS	NS
IL-1 β	NS	NS	NS	NS	NS
1L-10	NS	NS	↑*	NS	NS

Inflamação cerebral-hipocampo					
IL-6	NS	↑*	↓#	NS	↓# ↑\$p=0,056
IL-1β	NS	NS	NS	NS	NS
IL-10	NS	NS	↑*#	NS ↓\$p=0,078	NS ↓\$p=0,078
Ativação microglial					
Hipocampo	NS	NS	NS	NS	NS
Quantificação de glutamato					
Pré-frontal	NS	NS	↑*#	NS	↓\$
Amígdala	NS	NS	↑#	NS	NS
Hipocampo	NS	↓*	↑#	↑#	↓*\$&
Quantificação de BAX					
Pré-frontal	NS	↑*	↓#	NS	NS
Amígdala	NS	↑*	↓#	↑*\$	↑*\$
Hipocampo	NS	NS	NS	↑#\$	↑#\$
Quantificação de Bcl-2					
Pré-frontal	NS	↓*	↑#	↓*\$	↓*\$
Amígdala	NS	NS	↑*#	↓\$	↑#&
Hipocampo	NS	↓*	NS	↓*	NS
Quantificação de PSD-95					
Pré-frontal	NS	NS	↑#	↓\$	NS
Amígdala	NS	NS	NS	NS	NS
Hipocampo	NS	↓*	NS	NS	NS

Legenda: NS- Não significativo; ↑ aumentou; ↓ diminuiu; * p<0,05 versus sham; # p<0,05 versus CLP; \$ p<0,05 versus CLP+DEX; & p<0,05 versus CLP+IDA. Fonte: Autora, 2022.

ANEXO D – Quadro com resumo dos resultados, etapa I, 10 dias.

Quadro 2 – Resumo dos resultados obtidos na etapa I dos experimentos, **10 dias** após tratamentos: Expressão dos receptores, inflamação cerebral e sistêmica, ativação microglial, quantificação de glutamato, níveis proteicos de BAX, Bcl-2 e PSD-95, avaliação comportamental e sobrevivência.

Grupos	Sham	CLP	CLP+DEX	CLP+IDA	CLP+IDA+DEX
Análises					
Expressão dos receptores – pré-frontal					
α -2a	NS	NS	↓*#	↓*#	↓*#
α -2c	NS	NS	↓*#	NS	↓*#
Expressão dos receptores – amígdala					
α -2a	NS	NS	↓*#	↓*#	↓*#
α -2c	NS	NS	↓*	NS	↓*#&
Expressão dos receptores – hipocampo					
α -2a	NS	↓*#	↓*#	↓*#	↓*#
α -2c	NS	NS	↓*	NS	↓*
Inflamação sistêmica					
IL-6	NS	NS	NS	NS	NS
IL-1 β	NS	↑*	↓#	NS	↓#&
1L-10	NS	NS	NS	NS	↓\$
Inflamação cerebral-pré-frontal					
IL-6	NS	NS	NS	↑*	NS
IL-1 β	NS	↑*	↓#	↓#	↓#
1L-10	NS	NS	NS	NS	NS
Inflamação cerebral-amígdala					
IL-6	NS	NS	NS	NS	NS
IL-1 β	NS	NS	↓#	NS	↓#
1L-10	NS	NS	NS	NS	NS
Inflamação cerebral-hipocampo					
IL-6	NS	NS	NS	NS	NS
IL-1 β	NS	NS	↓#	NS	↓#
1L-10	NS	NS	NS	NS	NS

Ativação microglial					
Hipocampo	NS	↑*	NS	NS	↑*\$&
Quantificação de glutamato					
Pré-frontal	NS	NS	NS	NS	NS
Amígdala	NS	NS	NS	NS	NS
Hipocampo	NS	NS	NS	NS	NS
Quantificação de BAX					
Pré-frontal	NS	NS	NS	NS	NS
Amígdala	NS	NS	NS	↑\$	NS
Hipocampo	NS	NS	NS	NS	NS
Quantificação de Bcl-2					
Pré-frontal	NS	↓*	NS	↓*\$	↑&
Amígdala	NS	NS	NS	NS	NS
Hipocampo	NS	NS	NS	NS	NS
Quantificação de PSD-95					
Pré-frontal	NS	NS	NS	NS	NS
Amígdala	NS	NS	NS	NS	NS
Hipocampo	NS	NS	NS	NS	NS
Comportamento					
Esquiva inibitória	↑TL	NS	↑TL	NS	NS
Reconhecimento de novos objetos	↑IRO	NS	↑IRO	NS	NS
Habituação a campo aberto	↓C/↓L	NS/NS	↓C/↓L	NS/↓L	NS/↓L
Sobrevivência					
10 dias	NS	↓*	↓*	↓*	↓*

Legenda: NS- Não significativo; ↑ aumentou; ↓ diminuiu; TL- tempo de latência; C- cruzamentos; L- levantamentos; IRO- índice de reconhecimento; * p<0,05 versus sham; # p<0,05 versus CLP; \$ p<0,05 versus CLP+DEX; & p<0,05 versus CLP+IDA

ANEXO E – Quadro com resumo dos resultados, etapa I, 30 dias.

Quadro 3 – Resumo dos resultados obtidos na etapa I dos experimentos, **30 dias** após tratamentos: Expressão dos receptores, inflamação cerebral e sistêmica, ativação microglial, quantificação de glutamato, níveis proteicos de BAX, Bcl-2 e PSD-95, avaliação comportamental e sobrevivência.

Grupos	Sham	CLP	CLP+DEX	CLP+IDA	CLP+IDA+DEX
Análises					
Expressão dos receptores – pré-frontal					
α -2a	NS	NS	NS	NS	NS
α -2c	NS	NS	NS	NS	NS
Expressão dos receptores – amígdala					
α -2a	NS	NS	NS	↓*#\\$	NS
α -2c	NS	NS	NS	NS	NS
Expressão dos receptores – hipocampo					
α -2a	NS	NS	NS	NS	NS
α -2c	NS	NS	NS	NS	NS
Inflamação sistêmica					
IL-6	NS	NS	NS	NS	NS
IL-1 β	NS	NS	NS	NS # p=0,055	NS
IL-10	NS	NS	NS	NS	NS
Inflamação cerebral-pré-frontal					
IL-6	NS	NS	NS	NS	NS
IL-1 β	NS	NS	NS	↑*	NS
IL-10	NS	NS	NS	NS	NS
Inflamação cerebral-amígdala					
IL-6	NS	NS	NS	NS	NS
IL-1 β	NS	NS	NS	NS	NS
IL-10	NS	NS	NS	NS	NS
Inflamação cerebral-hipocampo					
IL-6	NS	↑*	↓#	NS	↓#
IL-1 β	NS	NS	NS	NS	NS
IL-10	NS	NS	NS	NS	NS

Ativação microglial					
Hipocampo	NS	NS	NS	↑\$	↑\$
Quantificação de glutamato					
Pré-frontal	NS	NS	↓*#	↑\$	↑\$
Amígdala	NS	↑*	↓*#	↑*\$	↑*\$
Hipocampo	NS	↑*	↑*/↓#	↑*\$	↑*\$
Quantificação de BAX					
Pré-frontal	NS	NS	NS	NS	NS
Amígdala	NS	NS	NS	↑*\$	NS
Hipocampo	NS	NS	NS	NS	NS
Quantificação de Bcl-2					
Pré-frontal	NS	NS	NS	NS	NS
Amígdala	NS	↓*	NS	NS	NS
Hipocampo	NS	NS	NS	NS	NS
Quantificação de PSD-95					
Pré-frontal	NS	NS	NS	NS	NS
Amígdala	NS	NS	NS	NS	NS
Hipocampo	NS	NS	NS	↓*	↓*
Comportamento					
Esquiva inibitória	↑TL	NS	↑TL	NS	↑TL
Reconhecimento de novos objetos	↑IRO	NS	↑IRO	NS	NS
Habituação a campo aberto	↓C/↓L	NS/NS	↓C/↓L	NS/↓L	NS/NS

Legenda: NS- Não significativo; ↑ aumentou; ↓ diminuiu; TL- tempo de latência; C- cruzamentos; L- levantamentos; IRO- índice de reconhecimento; * p<0,05 versus sham; # p<0,05 versus CLP; \$ p<0,05 versus CLP+DEX; & p<0,05 versus CLP+IDA.

ANEXO F – Quadro com resumo dos resultados, etapa II, logo após tratamentos.

Quadro 4 – Resumo dos resultados obtidos na etapa II (tardio) dos experimentos, **logo após tratamento**: Ativação microglial e avaliação comportamental.

Grupos	Sham	CLP	CLP+DEX	CLP+IDA	CLP+IDA+DEX
Análises					
Ativação microglial					
Hipocampo	NS	↑*	NS	↑*	↑*
Comportamento					
Esquiva inibitória	↑TL	NS	↑TL	↑TL	↑TL
Reconhecimento de novos objetos	↑IRO	NS	↑IRO	NS	NS
Habituação a campo aberto	↓C/↓L	NS/NS	NS/↓L	↓C/↓L	NS/NS

Legenda: NS- Não significativo; ↑ aumentou; ↓ diminuiu; TL- tempo de latência; C- cruzamentos; L- levantamentos; IRO- índice de reconhecimento; * p<0,05 versus sham; # p<0,05 versus CLP; \$ p<0,05 versus CLP+DEX; & p<0,05 versus CLP+IDA.

ANEXO G – Quadro com resumo dos resultados, etapa II, 30 dias após sepse.

Quadro 5 – Resumo dos resultados obtidos na etapa II (tardio) dos experimentos, **30 dias após sepse**: Ativação microglial e avaliação comportamental.

Grupos	Sham	CLP	CLP+DEX	CLP+IDA	CLP+IDA+DEX
Análises					
Ativação microglial					
Hipocampo	NS	↑*	NS	NS	NS
Comportamento					
Esquiva inibitória	↑TL	NS	↑TL	NS	↑TL
Reconhecimento de novos objetos	↑IRO	NS	↑IRO	NS	NS
Habituação a campo aberto	↓C/↓L	NS/NS	↓C/↓L	NS/↓L	NS/↓L

Legenda: NS- Não significativo; ↑ aumentou; ↓ diminuiu; TL- tempo de latência; C- cruzamentos; L- levantamentos; IRO- índice de reconhecimento; * p<0,05 versus sham; # p<0,05 versus CLP; \$ p<0,05 versus CLP+DEX; & p<0,05 versus CLP+IDA.

**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 N° 609 de 14.03.2019

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata MARIANE ROCHA ABATTI, sob o título “EFEITOS DA DEXMEDETOMIDINA SOBRE ALTERAÇÕES COGNITIVAS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA SEPSE” do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “APROVAÇÃO” da Tese.

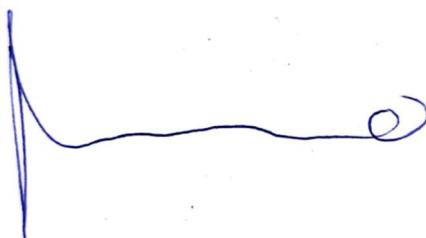
Criciúma, SC, 22 de julho de 2022.

Profa. Dra. GISLAINE ZILLI RÉUS
Membro Relator – UNESC

Profa. Dra. TATIANA BARICHELLO
Membro Interno – UNESC



Prof. Dr. DANIEL GELAIN
Membro Externo – UFRGS



Prof. Dr. HUGO CASTRO
Membro Externo – Fiocruz



Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Orientador



Prof. Dr. Emilio Luiz Streck