

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

**MÁGADA TESSMANN SCHWALM**

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE  
NEURODEGENERAÇÃO E DANO COGNITIVO A LONGO  
PRAZO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES A SÉPSE**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade  
do Extremo Sul Catarinense para  
obtenção do título de Doutor em  
Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Ritter  
Coorientador: Prof. Dr. Felipe Dal  
Pizzol

**CRICIÚMA**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S437a Scwalm, Mágada Tessmann.

Avaliação de biomarcadores de neurodegeneração e dano cognitivo a longo prazo em animais sobreviventes a sépsse / Mágada Tessmann Scwalm ; orientadora: Cristiane Ritter; coorientador: Felipe Dal Pizzol. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.

96 p : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul

Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2014.

1. Sepse. 2. Septicemia. 3. Metaloproteinase. 4. Antioxidantes. 5. Sistema nervoso - Degeneração. I. Título.

CDD. 22<sup>a</sup> ed. 616.944



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

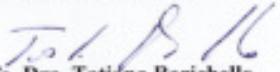
---

## PARECER

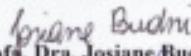
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Márgada Tessmann Schwalm** sob o título “**Avaliação de biomarcadores de neurodegeneração e dano cognitivo a longo prazo em animais sobreviventes a sepsis**” para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** 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, com conceito B.

Criciúma, SC, 03 de fevereiro de 2014.

  
**Prof. Dra. Tatiana Barichello**

Membro Relator - UNESC

  
**Prof. Dra. Josiane Budni**

Membro Interno – UNESC

  
**Prof. Dr. Michael Andrades**

Membro Externo - UFRGS

  
**Prof. Dr. Roger Walz**

Membro Externo - UFSC

  
**Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol**  
Coordenador

  
**Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza**  
Coordenador do PPGCS



## **FOLHA INFORMATIVA**

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

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental



## AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus o criador do céu e da terra, e que por misericórdia e graça se tornou homem e veio para os seus e veio para me salvar.

Agradeço a minha Orientadora Cristiane Ritter, que com empenho me orientou.

Agradeço ao meu coorientador Felipe Dal Pizzol, que compartilhou de seu grande conhecimento para o desenvolvimento desta tese.

Agradeço a minha querida Cristiane Damiani Tomazi e Larissa Constantino que foram essenciais nesta etapa de minha vida.

Agradeço a equipe maravilhosa do Laboratório (Fisiopat), com certeza sem o trabalho conjunto não haveria tese.

Agradeço a Dra. Luciane Bisognin Ceretta, que na época de meu ingresso no Doutorado estava Coordenadora do Curso de Graduação em Enfermagem e me incentivou de forma especial a buscar qualificação profissional.

Agradeço aos homens da minha vida, meu esposo Hugo e meu filho Lucas por terem compreendido os momentos de ausência e não terem desistido de mim.

Agradeço a minha amiga Vera Rodrigues de Souza, pela incansável oração que tem dispendido há mim dia a dia.

Agradeço a Professora Tatiana Barichello que foi uma das pessoas que me trouxe para a Unesc, obrigado pela confiança.

Agradeço as pessoas que contribuíram com minha qualificação.



## RESUMO

Sobreviventes a sepse apresentam danos cognitivos associados com a diminuição da qualidade de vida e aumento da morbidade a longo prazo. Algumas destas alterações se assemelham aos mecanismos fisiopatológicos de doenças neurodegenerativas. O receptor para produto final de glicolização avançada (RAGE) vem sendo associado à progressão de morte neuronal em muitas doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer, além de ser um importante mediador pró-inflamatório. Estudos anteriores mostraram que o uso de Inibidor de metaloproteinase de matriz (MMP) ou antioxidante (ATX) podem auxiliar na redução do dano cognitivo. Analisaram-se parâmetros bioquímicos relacionados à neurodegeneração em animais sobreviventes a sepse e o possível envolvimento do RAGE; o teste de esQUIVA inibitória e uso de Inibidor de MMP e ATX em animais sobreviventes a sepse. Os animais foram submetidos à sepse por ligação cecal e punção (CLP) e trinta dias após a indução, hipocampo e córtex pré-frontal foram isolados. No primeiro experimento o imunoconteúdo do peptídeo amilóide- $\beta$  (A $\beta$ ),  $\alpha$ -sinucleína, sinaptofisina e *tau* fosforilada foram analisados por *western blot*. Além disso, verificou-se o imunoconteúdo de RAGE e a presença de S100 $\beta$ . Houve aumento de  $\alpha$ -sinucleína, A $\beta$  e *tau* fosforilada no hipocampo, mas não no córtex pré-frontal. O imunoconteúdo de RAGE esteve aumentado nas duas estruturas e S100 $\beta$  não apresentou diferenças quando comparadas ao controle, em ambas as estruturas. No segundo experimento, foram determinados os níveis de A $\beta$  e sinaptofisina (procedimentos idênticos ao experimento 01) e realizada a esQUIVA inibitória, onde os dados mostraram que a latência na esQUIVA inibitória foi significativamente reduzida no grupo sepse quando comparados ao *sham*, sugerindo dano na memória aversiva. No terceiro experimento foram adotados procedimentos conforme experimento 01 quanto aos animais, com exceção de alguns animais que foram tratados imediatamente a indução da sepse com ATX e inibidor de MMP 2-9 e posteriormente o teste da esQUIVA inibitória (conforme experimento 02). Apesar do fato de a esQUIVA inibitoria ser uma tarefa dependente do hipocampo, não foi possível determinar uma diminuição nos níveis de sinaptofisina no hipocampo ou uma relação do aumento dos níveis de A $\beta$  e RAGE no hipocampo com desempenho no teste da



esquiva inibitória. No córtex pré-frontal foi observada queda dos níveis de sinaptofisina e com pequeno aumento nos seus níveis de tratamento, melhorou o desempenho da memória. O tratamento com ATX precoce pode diminuir o deficit cognitivo a longo prazo em animais.

Conclui-se que o cérebro dos animais sobreviventes a sepse apresentam vários marcadores de neurodegeneração e o desempenho no teste de esquiva inibitória parece ser dependente dos níveis de alguns destes marcadores, sugerindo um fenômeno neurodegenerativo podendo este ser um fator importante na associação com dano cognitivo a longo prazo em ratos sobreviventes a sepse.

**Palavras-chave:** sepse; neurodegeneração; RAGE; disfunção cerebral; dano cognitivo a longo prazo, inibidor de metaloproteinase e antioxidantes.



## ABSTRACT

Sepsis survivors have cognitive impairments associated with decreased quality of life and increased long-term morbidity. Some of these changes are similar to the pathophysiology of neurodegenerative diseases. The receptor for advanced glycation end product ( RAGE) has been associated with progression of neuronal death in many neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, and is an important pro- inflammatory mediator. Previous studies have shown that the use of metalloproteinase inhibitor or antioxidant can assist in reducing cognitive impairment. We analyzed biochemical parameters related to neurodegeneration in animal sepsis survivors and the possible involvement of RAGE, the inhibitory avoidance test and use of Metalloproteinase Inhibitor and Antioxidant in animals surviving sepsis. The animals were subjected to sepsis by cecal ligation and puncture ( CLP ) and thirty days after induction, hippocampus and prefrontal cortex were isolated. In the first experiment the immunocontent the  $\beta$  - amyloid peptide ( A $\beta$  ),  $\alpha$  - synuclein, synaptophysin and phosphorylated tau were analyzed by western blot. Furthermore, it was found that the RAGE immunocontent the presence of S100 $\beta$ . An increase of  $\alpha$  -synuclein, tau and phosphorylated Ab and the hippocampus, but not in the prefrontal cortex. The immunocontent RAGE was increased in the two structures and S100 $\beta$  showed no differences compared to controls in both structures. In the second experiment, we determined the levels of A $\beta$  and synaptophysin ( identical to experiment 01 procedures ) and performed the inhibitory avoidance, where the data showed that the inhibitory avoidance latency was significantly reduced in sepsis group compared to sham, suggesting damage to the memory aversive. In the third experiment procedures as experiment 01 were adopted for the animals, except for a few animals that were immediately treated the induction of sepsis with ATX and MMP 2-9 and subsequently testing the inhibitory avoidance (as experiment 02 ). Despite the fact that the inhibitory avoidance task to be a dependent of the hippocampus, it was not possible to determine a decrease in the levels of synaptophysin in the hippocampus or a relationship of increased levels of A $\beta$  and RAGE in the hippocampus with test performance of inhibitory avoidance. In the prefrontal cortex



synaptophysin levels drop and small increase in their levels of treatment was observed, improved memory. The early treatment with antioxidants can decrease cognitive impairment in long-term animals. We concluded that the brains of animals surviving sepsis have several markers of neurodegeneration and performance in the inhibitory avoidance test seems to be dependent on the levels of some of these markers, suggesting a neurodegenerative phenomenon this may be an important factor in cognitive impairment associated with long term rat sepsis survivors.

**Keywords** : sepsis; neurodegeneration; RAGE; brain dysfunction, cognitive impairment in the long term, metalloproteinase inhibitor and antioxidants.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Sequência de eventos sugerida em uma infecção sistêmica.....	35
Figura 2: Fatores envolvidos na fisiopatologia da encefalite associada à Sepses.....	38
Figura 3: Ligação cecal e Perfuração (CLP) .....	48
Figura 4: Esquiva Inibitória (treino simples).....	50
Figura 5: Imunoconteúdo de A $\beta$ em hipocampo de animais sobreviventes a sepses.....	53
Figura 6: Imunoconteúdo de A $\beta$ em córtex pré-frontal de animais sobreviventes a sepses.....	54
Figura 7: Imunoconteúdo de RAGE em hipocampo de animais sobreviventes a sepses.....	38
Figura 8: Imunoconteúdo de RAGE em córtex pré-frontal de animais sobreviventes a sepses.....	56
Figura 9: Imunoconteúdo de sinaptofisina em hipocampo de animais sobreviventes a sepses.....	57
Figura 10: Imunoconteúdo de sinaptofisina em córtex pré-frontal de animais sobreviventes a sepses.....	58
Figura 11: Imunoconteúdo de $\alpha$ -sinucleína em hipocampo de animais sobreviventes a sepses.....	59
Figura 12: Imunoconteúdo de $\alpha$ -sinucleína em córtex pré-frontal de animais sobreviventes a sepses.....	60
Figura 13: Imunoconteúdo de tau fosforilada em hipocampo de animais sobreviventes a sepses.....	61
Figura 14: Imunoconteúdo de tau fosforilada em córtex pré-frontal de animais sobreviventes a sepses.....	62
Figura 15: Imunoconteúdo de S100 $\beta$ em hipocampo de animais sobreviventes a sepses.....	63
Figura 16: Imunoconteúdo de S100 $\beta$ em córtex pré-frontal de animais sobreviventes a sepses.....	64
Figura 17: Desempenho no teste de esquiva inibitória relacionado aos níveis de sinaptofisina no córtex pré-frontal.....	65
Figura 18: Imunoconteúdo de A $\beta$ no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais sobreviventes a sepses tratados com ATX e MMP.....	58



Figura 19: Imunoconteúdo de Sinaptofisina no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais sobreviventes a sepse tratados com ATX e MMP..	57
Figura 20: Prevenção do déficit cognitivo a longo prazo em animais sobreviventes a sepse por tratamento com ATX ou inibidor de MMP2 e MMP-9.....	58



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AGEs – Produtos da Glicação (do inglês, *Glycation Products*)
- APP – Proteína Precursora Amiloide (do inglês, *Amyloid Precursor Protein*)
- ATP – Trifosfato Adenosina (do inglês, *Adenosine Triphosphate*)
- ATX – Antioxidantes
- A $\beta$  – Beta-Amilóide
- BACE1 – Enzima da Fenda Local- $\square$  APP (do inglês,  *$\beta$ -site APP Cleaving Enzyme 1*)
- CD – Agrupamento de Diferenciação (do inglês, *collation of differentiation*)
- CLP – Ligação Cecal e Perfuração
- COX – Cicloxigenase
- c-PGES – Prostaglandina Sintase Citosólica (do inglês, *Prostaglandin Synthase Cytosolic*)
- DA – Doença de Alzheimer
- DAMPs – Padrão Molecular Associado a Dano (do inglês, *Damage Associated Molecular Pattern*)
- DFX – Deferoxamina
- EAS – Encefalopatia Associada a Sepsis
- EEG – Eletroencefalograma
- eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial (do inglês, *Endothelial Nitric Oxide Synthase*)
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- GSH – Glutathiona Peroxidase
- HD – Hidroxila
- HMGB1 – Proteínas do Grupo de Alta Mobilidade Box 1 (do inglês, *High Mobility Group B*)
- HPA – Hipófise-pituitária-adrenal
- IL – Interleucina
- iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzível (do inglês, *Inducible Nitric Oxide Synthase*)
- IRAKs– Quinases Receptoras (do inglês, *Receptor Kinases*)
- LBP – Proteína de Ligação de Lipopolissacarídeo (do inglês, *Lipopolysaccharide Binding Protein*)
- LPS – Lipopolissacarídeo (do inglês, *Lipopolysaccharide Protein Binding*)



MEC – Matriz Extracelular  
MMP – Metaloproteinase de Matriz (do inglês, *Matrix Metalloproteinase*)  
MAPK – Mitógeno Ativador da Proteína Quinase (do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinase*)  
MAPs – Proteínas Associadas a Microtubos (do inglês, *Microtubule-Associated Proteins*)  
MCP – Proteína Quimiotática de Monócitos do inglês, *Protein Chemotactic Monocyte*)  
MD – Diferenciação Mielóide ( do inglês, *Myeloid Differentiation*)  
MIP – Proteína Inflamatória de Macrófagos (do inglês, *Macrophage Inflammatory Protein*)  
mPGEs-2 – Prostaglandina e Sintase-2 Associada à Membrana (do inglês, *Prostaglandin and Synthase-2-Associated Membrane*)  
MyD88 – Fator de Diferenciação Mielóide 88 ( do inglês, *Myeloid Differentiation Factor 88*)  
NAC – N-acetilcisteína.  
NADPH – Dinucleotídeo Nicotinamida Adenina Fosfato Redzida (do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Redzida*)  
NF-κB – Fator Nuclear-κB (do inglês, *Nuclear Factor-κB*)  
NO – Óxido Nítrico (do inglês, *Nitric Oxide*)  
PAMP – Padrão Molecular Associado a Patógeno (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Pattern*)  
PCT – Procalcitonina  
PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina 2  
RAGE – Receptor para Produtos Finais de Glicosilação Avançada (do inglês, *Receptor for Advanced Glycosylation end Products*)  
SAD – Delirium Associado a Sepse (do inglês, *Sepsis-associated Delirium*)  
SAPK/JNK – Proteína Quinase Ativada por Estresse/ c-Jun N-terminal quinase (do inglês, *Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*)  
SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (do inglês, *Systemic Inflammatory Response Syndrome*)  
SNC – Sistema Nervoso Central  
TCE – Traumatismo Crânio Encefálico  
TIMP – Inibidores Específicos de MMPs (do inglês, *Specific Inhibitors of MMPs*)



TIRAP – Proteína Adaptadora do Domínio TIR (do inglês, *TIR Adaptor Protein Domain*)

TLR – Receptor Toll-Like (do inglês, *Toll-like Receptor*)

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês, *Tumor Necrosis Factor-alpha*)

TRAFs – Fatores Associados ao Receptor do Fator de Necrose Tumoral (do inglês, *Tumor Receptor Associated Factor*)

TRAM – Molécula Adaptadora Relacionada com o TRIF (do inglês, *Adaptor Molecule TRIF-Related*)

TRIF – Proteína Adaptadora do Domínio TIR (do inglês, *Adaptor Protein TIR Domain*)

UTI – Unidade de Terapia Intensiva



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	30
1.1 SEPSE: DEFINIÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	30
1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE.....	31
1.3 SEPSE E SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	34
1.3.1 Marcadores da Sepse.....	39
1.3.2 Antioxidante e Metaloproteinase no tratamento da Sepse.....	42
2. OBJETIVOS.....	45
2.1 OBJETIVO GERAL.....	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
3. METODOLOGIA.....	46
3.1 DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO 01.....	46
3.1.1 Animais.....	46
3.1.2 Indução de Sepse.....	47
3.1.3 Análise por <i>Western Blot</i> .....	48
3.1.4 Análise Estatística.....	49
3.2 DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO 02.....	49
3.2.1 Animais.....	49
3.2.2 Indução de Sepse.....	49
3.2.3 Análise por <i>Western Blot</i> .....	49
3.2.3 Teste de esquiva inibitória.....	50
3.3 DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO 03.....	50
3.3.1 Animais.....	51
3.3.2 Indução de Sepse.....	51
3.3.3 Análise por <i>Western Blot</i> .....	51
3.3.4 Teste de esquiva inibitória.....	51
3.3.5 Análise Estatística.....	51
4.RESULTADOS.....	52
4.1 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 01.....	52
4.1.1 Avaliação do imunocontéudo de A $\beta$ , RAGE e sinaptofisina em hipocampo e cortex pré-frontal.....	52
4.1.2 Avaliação do imunocontéudo de $\alpha$ -sinucleína, tau fosforilada e S100 $\beta$ em hipocampo e cortex pré-frontal.....	59
4.2 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 02.....	64
4.2.1 Determinação da relação entre níveis de beta-amilóide e sinaptofisina com alterações cognitivas em longo prazo.....	64
4.3 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 03.....	66
4.3.1 Avaliação do imunocontéudo de A $\beta$ e tratamento com inibidor de MMP e ATX.....	66



<b>4.3.2 Avaliação do imunoconteúdo de Sinaptofisina e tratamento com inibidor de MMP e ATX.....</b>	<b>67</b>
<b>4.2.3 Teste de comportamento.....</b>	<b>68</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Sepses: definição e aspectos epidemiológicos

Na ocorrência de um processo infeccioso é desencadeada uma resposta inflamatória no hospedeiro, sendo que, a magnitude desta resposta pode variar de indivíduo para indivíduo. Essa interação complexa entre o organismo e o agente causador resulta no processo fisiopatológico que por muito tempo era denominado como septicemia, sendo atualmente reconhecido como sepse (Vicent & Korkut, 2008).

O uso de uma terminologia específica tornou-se uma necessidade, para que fosse possível complementar as novas descobertas sobre a fisiopatologia da sepse. Sendo assim, o *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*, definiu em 1991 um consenso sobre terminologia e terapêutica da sepse, definindo-a como resposta clínica decorrente de uma infecção. Entretanto, resposta similar ou mesmo idêntica pode surgir na ausência de infecção documentada, recomendando-se o uso do termo Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) como o mais apropriado para este quadro clínico. SIRS é então definida como a presença de dois ou mais dos seguintes quadros de inflamação sistêmica: 1) hipertermia ou hipotermia; 2) leucocitose ou leucopenia; 3) taquicardia e 4) taquipnéia ou hiperventilação (Bone *et al.*, 1992).

O consenso *Surviving Sepsis Campaign* (2012) define sepse como a presença (suspeita ou documentada) de infecção juntamente com manifestações clínicas de inflamação. Ainda, como resposta inflamatória apresenta uma grande variação entre os diferentes indivíduos acometidos e diferentes graus definidos, como: sepse grave e choque séptico. A sepse grave foi definida pela presença de sepse somada à disfunção orgânica ou hipoperfusão tecidual em decorrência da própria sepse. O choque séptico define-se como hipotensão persistente em decorrência da sepse, mesmo com uso de reposição volêmica adequada (Dellinger *et al.*, 2012).

Juntos, choque séptico e sepse grave são considerados importantes causas de problemas de saúde, afetando milhões de pessoas em todo o mundo (Dellinger *et al.*, 2012). A incidência da sepse tem aumentado desde os anos 30 (Dombrovskiy *et al.*, 2007), e a partir das evidências, sugere-se que este aumento persista nos próximos anos (Kung *et al.*, 2008). Dados de mortalidade indicam (desde 2003) que a sepse está entre as 10 causas mais comuns de morte nos Estados Unidos

(Kung *et al.*, 2008), onde se relata incidência de pelo menos 11,5 pacientes/100.000 habitantes, com taxa de mortalidade entre 25% e 30% por sepse grave e entre 40% e 70% por choque séptico (Angus, *et al.*, 2001). Dados do *datasus* mostram que em 2012 ocorreram 84 mil internações por sepse, com 35 mil óbitos (42%). Um estudo brasileiro (Sales Júnior, *et al.*, 2006) que incluiu 75 unidades de terapia intensiva (UTI), mostra que 16,7% dos pacientes foram identificados com sepse, sepse grave ou choque séptico e a mortalidade global após 28 dias da admissão na UTI foi de 46,6%.

## 1.2 Fisiopatologia da Sepse

Para Portella (2010), os papéis de alguns mediadores na patogênese da sepse, já estão bem esclarecidos e estes mediadores podem induzir grandes alterações na fisiologia da vasculatura e dos órgãos. Dentre os mediadores envolvidos na gênese da sepse, destacam-se as citocinas e quimiocinas, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e proteínas do grupo de alta mobilidade Box 1 (HMGB1).

Marshall e colaboradores (2010) consideram a sepse uma consequência indireta da atividade de mediadores inflamatórios derivados do hospedeiro e não resultante de uma ação direta dos microrganismos ou de seus produtos. Considera-se na fisiopatologia da sepse, a complexa interação entre microrganismos infectantes e as respostas imunes, pró-inflamatórias e pró-coagulantes do hospedeiro (Bone, 1996a,b; Hotchkiss & Karl, 2003).

Singer (2008) propõe que processos inflamatórios exagerados estejam associados a complexas interações genéticas, hormonais, metabólicas e da macro e micro disfunção celular do organismo afetado, desencadeado pela hiperativação do complexo de cascatas pró-inflamatórias que provocam a ativação de células do sistema imunológico com intensa produção de citocinas pró-inflamatórias nestas células.

O sistema imune conta com componentes inatos e adquiridos. A imunidade adquirida é mediada por linfócitos T e B, tem alta especificidade para microrganismos através da combinação dos receptores com moléculas dos patógenos. É capaz de ativar fatores de transcrição e de promover secreção de citocinas pró-inflamatórias junto às células T, além de aumentar a síntese de citocinas anti-inflamatórias (Interleucina - 4 (IL-4), Interleucina - 10 (IL-10), Interleucina - 13 (IL-13)), modular a expressão de receptores de citocinas e liberar

receptores solúveis e antagonistas, bem como atuar sobre o sistema imune inato (Sikora *et al.*, 2001; Faix, 2013). No entanto o estabelecimento da imunidade adquirida não é rápida o suficiente para a erradicação dos microrganismos, principalmente bactérias extracelulares. Assim, a rápida resposta da imunidade inata tem papel importante na defesa do hospedeiro, durante os estágios iniciais da infecção (Sikora *et al.*, 2001).

As células do sistema imune inato, as quais incluem monócitos, macrófagos e neutrófilos compõe a primeira linha de resposta a infecção e lesão (Wang; Deng., 2008). A imunidade inata é resultante de um sistema inespecífico de defesa imunológico encontrado em organismos multicelulares. Durante a infecção, a imunidade inata faz o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), tais como lipopolissacarídeo (LPS), peptidoglicano, RNA de fita dupla; ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), tais como proteína do choque térmico, ácido úrico, anexinas, e HMGB1, usando receptores de reconhecimento – como os receptores *Toll-like* (TLR) 2, 4 e 9 (Brightbill *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2003b).

A sinalização TLR pode induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras, as quais são ativadas não apenas pela imunidade inata, como também pela imunidade adquirida (Kaisho; Akira, 2002). As células da imunidade inata infiltram nos tecidos infectados e liberam diversas citocinas, como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-6, IL-12 e quimiocinas como IL-8, proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1s e MIP-2) e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) (Baggiolini & Loetscher, 2000; Luster *et al.*, 2005; Wang & Deng, 2008). Em resposta a infecção ou dano causado pelos microrganismos o sistema imune inato responde imediatamente ao estímulo, removendo os patógenos invasores e após sua eliminação ocorre uma regressão do quadro inflamatório retornando a homeostase imunológica. Os patógenos ou mediadores pró-inflamatórios endógenos podem extravasar para a corrente sanguínea, ocasionando a sepse (Wang & Deng, 2008).

A via mais detalhadamente conhecida para ativação do sistema imune inato depende da ativação de TLR4 pelo LPS. O LPS tem sua maior atividade biológica no componente lipídico - lipídio A - quando liberado na corrente sanguínea, diretamente ou ligado a proteína de ligação de lipopolissacarídeo (LBP), é capaz de se ligar ao agrupamento de diferenciação (CD14), que facilita a ligação LPS-CD14,

e a sinalização através do complexo proteína de diferenciação mieloide (TLR-4/MD-2) (Concha, 2010). O LPS pode ligar-se a outros receptores, como o CD11b/ CD18, ou mesmo ser internalizado através de poros da membrana, pelos canais iônicos (Concha, 2010).

Para Van Der Poll (2008), os TLRs interagem com proteínas adaptadoras com a do Fator de Diferenciação Mieloide 88 (MyD88) e utiliza outras proteínas adaptadoras como a proteína adaptadora do TIR (TIRAP), capaz de induzir o interferon- $\beta$  (TRIF). Interage ainda com a molécula adaptadora relacionada com o TRIF (TRAM), que são recrutadas para o receptor e ativam o complexo composto por quinases associadas ao receptor da IL-1 (IRAKs), e aos Fatores Associados ao Receptor do Fator de Necrose Tumoral (TRAFs) que constituem fatores de transdução de sinal, que conduzem à liberação do fator nuclear-kB (NF-kB) que uma vez translocado para o núcleo, aumenta a expressão gênica de citocinas inflamatórias (Christmann *et al.*, 1998).

O NF-kB, quando ativado, promove a expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  IL-6 e também citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-4, que ativam a resposta imune adaptativa, responsável pela amplificação da imunidade inata (Christmann *et al.*, 1998).

As citocinas desempenham seu papel na fase inicial da resposta imune e inflamatória por compartilhar sinais intracelulares com receptores e distribuírem informações sobre o tipo de infecção e recrutar células efetivas para realização da defesa do hospedeiro (Heeg; Dalpke, 2003). Pacientes com sepse apresentam aumento dos níveis de citocinas como TNF $\alpha$ , IL-1 (Pruitt *et al.*, 1996; Oberholzer *et al.*, 2000). Em animais, quando as citocinas são injetadas, reproduzem características clínicas e laboratoriais de sepse, subsidiando assim ensaios clínicos que utilizem antagonistas de TNF e IL-1, bloqueadores de receptores *toll* na sepse (Hotchkiss *et al.*, 2013).

Estudos sobre as citocinas em pacientes mostraram em seus resultados que, juntamente com as citocinas pro-inflamatórias, a IL-10 (potente citocina antiinflamatória) está aumentadas, sendo que a alta proporção de IL-10 para TNF-  $\alpha$  esta correlacionada com mortalidade dos pacientes com infecção adquirida na comunidade (van Dissel *et al.*, 1998).

Apesar de, tanto o processo pró-inflamatório, quanto o antiinflamatório acontecer imediatamente após o início da sepse, de maneira geral há predominância de uma fase hiperinflamatória inicial, em proporções determinadas por diversos fatores que incluem a carga

bacteriana, virulência do patógeno, idade, fatores genéticos e comorbidades do hospedeiro. Por exemplo, um adulto jovem com meningococemia terá uma resposta hiperinflamatória intensa mediada por citocinas, as quais levam febre alta e choque séptico (Hotchkiss *et al.*, 2013). Já um paciente idoso portador de diabetes, submetido à hemodiálise, que desenvolve pneumonia, por exemplo, não mostra quaisquer sinais óbvios de sepse. Os únicos sinais para o diagnóstico neste paciente podem ser a redução do estado mental, incapacidade de tolerar a diálise por hipotensão; hipotermia e intolerância a glicose, não apresentando nenhuma resposta mais clara da infecção ou de uma reação antinflamatória predominante (Hotchkiss *et al.*, 2013).

### 1.3 Sepse e Sistema Nervoso Central

O dano cognitivo em longo prazo vem sendo relatado como uma seqüela de sepse (Gunther *et al.*, 2012; Semmler *et al.*, 2013). Estudos mostram que a prevalência de dano cognitivo moderado a grave é 10,6% maior em pacientes sobreviventes de sepse grave (Iwashyna *et al.*, 2010).

O cérebro é um dos primeiros órgãos afetados na sepse. O *delirium* associado a sepse (SAD) é uma característica frequentemente associada com maior morbidade e mortalidade (Iacobone *et al.*, 2009). Recentemente, foi observado entre sobreviventes de sepse, a diminuição da qualidade de vida e aumento da morbidade a longo prazo associados ao dano cognitivo (Winters *et al.*, 2010). Apesar do seu impacto clínico, a fisiopatologia da disfunção do sistema nervoso central (SNC) durante a sepse permanece pouco compreendida.

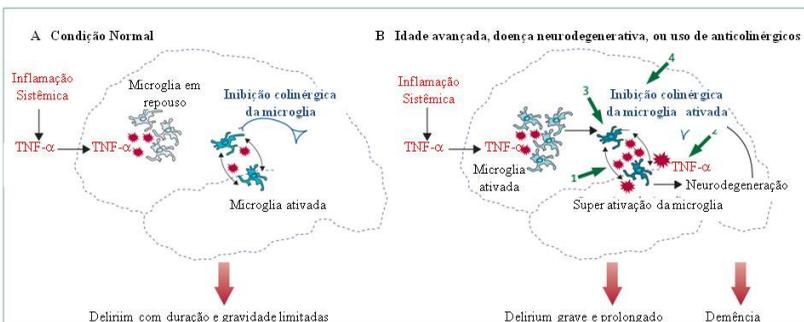
O diagnóstico da Encefalopatia Associada à Sepse (EAS) é principalmente clínico. A tomografia computadorizada costuma ser normal. O eletroencefalograma (EEG) mostra lentificação e diminuição principalmente da onda alfa e essas alterações estão relacionadas à diminuição do fluxo sanguíneo cerebral medido nas primeiras 24 h após a indução de endotoxemia por LPS em ratos Wistar (Semmler *et al.*, 2008).

A administração endovenosa de LPS (endotoxemia) ou de bactérias como a *Escherichia coli* (bacteriemia) é amplamente utilizada para o estudo da sepse, por mimetizar vários efeitos observados em pacientes com sepse e choque séptico, como, por exemplo, as alterações hemodinâmicas e cardiovasculares, diminuição do débito urinário, redução da perfusão tissular, hiporesponsividade a agentes

vasoconstritores, coagulação intravascular disseminada e a produção de grandes quantidades de citocinas na circulação (Benjamim, 2001).

Van Gool e colaboradores (2010), afirmam que infecções e drogas podem causar complicações neuropsiquiátricas. Pode ocorrer *delirium* mesmo sem que a infecção ocorra diretamente no SNC e não haver sinais sistêmicos de sepse. Estes autores demonstraram que as alterações periféricas ocasionadas pelo sistema imunológico são capazes de causar alterações também no SNC a partir dos caminhos que as citocinas percorrem até o cérebro, podendo ser: caminhos neurais diretos (via autônoma) em que o transporte ocorre através da barreira hematoencefalica ou pela região circunventricular, onde já se observaram níveis aumentados de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 em líquido de pacientes sépticos, mesmo na ausência de meningite (Waage *et al.*, 1989).

O TNF- $\alpha$  está associado a ativação da microglia e a liberação de citocinas no tecido cerebral. A microglia geralmente permanece em repouso, porém, sua ativação é essencial para resposta imune inata no cérebro. Devido sua linhagem de macrófagos e monócitos, a microglia é capaz de realizar fagocitose, apresentar antígenos, fazer rápida proliferação e secreção de uma série de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e proteases (Perry, 2004; Garden & Möller, 2006; Telling & Perry, 2009). Estes alteram a função cerebral, e provavelmente seja a causa de alterações do comportamento resultante de uma infecção sistêmica conforme mostra a figura 1 (van Gool *et al.*, 2010).



**Figura 1:** Sequência de eventos sugerida em uma infecção sistêmica em A) Condição Normal; B) Idade Avançada, doença Neurodegenerativa ou uso de anticolinérgicos onde 1) Inibição direta pelo uso de antiinflamatórios; 2)

Inibição dos efeitos das citocinas; 3) Receptores nicotínicos; 4) Medicamentos colinomiméticos (inibidores da colinesterase). Adaptado de van Gool *et al.*, 2010.

As substâncias tóxicas liberadas pela ativação da microglia podem não só causar *delirium* como também causar danos irreversíveis ao sistema neuronal. Van Gool e colaboradores (2010), relatam que o aumento de TNF- $\alpha$  após 10 meses da administração LPS pode ocasionar perda de substância nigra no cérebro de roedores em taxas de até 40%, pois ocasionam na microglia um círculo vicioso de liberação de substâncias neuroinflamatórias. Em última análise há propensão a neurodegeneração colinérgica, especialmente em idosos, tornando-os assim vulneráveis ao *delirium* depois de estímulos inocuos, assim como em indivíduos com doenças neurodegenerativas (van Gool *et al.*, 2010).

Teeling e Perry (2009) confirmam que apesar das fortes evidências do papel das citocinas, elas podem não ser os únicos fatores responsáveis pelo EAS. As alterações comportamentais podem surgir junto com a febre. Pode ocorrer ligação dos receptores da citocina ou do LPS expresso na vasculatura cerebral. Estes receptores são ligados a enzima cicloxigenase (COX) que permite a produção de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), os leucotrienos e tromboxanos. Há duas formas pelas quais as PGE<sub>2</sub> podem ser liberadas: 1) de forma rápida e transitória (COX-1, prostaglandina E sintase citosólica (c-PGES), prostaglandina E sintase-2 associada à membrana (mPGES-2); 2) de forma lenta, com produção contínua de PGE<sub>2</sub> (COX-2, mPGES-1) (Swiergiel & Dunn 2002; Turrin & Rivest 2004).

As lesões do córtex pré-frontal de camundongos, se associam com desinibição social, descontrole dos impulsos, disfunções organizacionais, de planejamento e atenção, quebra da fluência e retardo de comportamentos espontâneos (Lou, 1996). Déficits regionais do lobo frontal, particularmente do cíngulo anterior e córtex frontal, parecem diferenciar de forma consistente os pacientes com transtornos do SNC dos pacientes da população geral (Konarska *et al.*, 1990).

Há muito tempo o conceito de “privilegio imune” é atribuído ao cérebro, acreditando-se que o cérebro não seria acometido e nem contribuiria para a resposta inflamatória. Sabe-se, no entanto, que isso não é verdade. O cérebro apresenta sinais clássicos de inflamação, bem parecido em alguns aspectos com o que se observa em outros órgãos (Flierl *et.al.*, 2010). O aumento da permeabilidade vascular que ocorre na inflamação permite a passagem de mediadores inflamatórios e

interação com células do SNC. O SNC não é apenas suscetível, como contribuinte de forma ativa na resposta inflamatória.

As células do SNC percebem insultos periféricos e podem gerar mudanças neuroendócrinas, como em outros tecidos, onde há liberação de citocinas, radicais livres e ativação do complemento que agem localmente causando sintomas neurológicos e a distância perpetuando a resposta inflamatória (Lucas *et al.*, 2006).

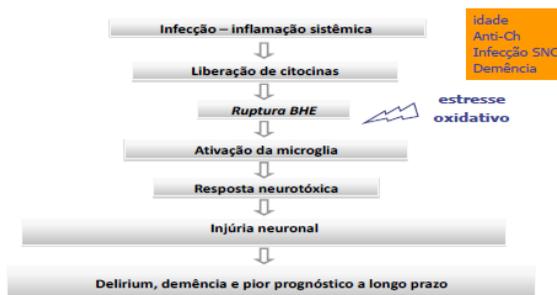
O cérebro possui maior taxa de consumo de O<sub>2</sub> e dispõe de poucas defesas antioxidantes, o que o torna bastante vulnerável durante sepse. O aumento de marcadores específicos de injúria cerebral, como enolase neurônio específica e a proteína S-100 $\beta$  ocorre na maioria dos pacientes com EAS (Iacobone *et al.*, 2009). Valores de S-100 $\beta$  acima de 4 $\mu$ g/dl estão relacionados a isquemia e hemorragia (visto na tomografia computadorizada), enquanto valores 1-2 $\mu$ g/dl estão associados a infartos microembólicos (visualizada na ressonância magnética). O aumento da S-100 $\beta$  tem associação direta com a alta mortalidade e é um preditor independente de sobrevida na terapia intensiva (Iacobone *et al.*, 2009).

Pressupõe-se que a resposta inflamatória ocorre de maneira semelhante em todos os órgãos (Wilson & Yong, 2003). Citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  encontram-se aumentadas na EAS e estimulam a produção de Óxido Nítrico (NO) induzida pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Wilson & Yong, 2003). NO é um fator importante para a autoregulação cerebral, é capaz de reagir com fatores oxidantes, induzir a produção de peroxinitrito e interferir na cadeia respiratória mitocondrial (Andersen *et al.*, 2004).

Há uma ineficiência no metabolismo mitocondrial com mudança no potencial de membrana e aumento do consumo de oxigênio. Este aumento pode estar relacionado ao aumento na produção de EROs e ativação da cascata de apoptose (Miranda, 2010). O dano oxidativo ocorre nas primeiras 6 horas no cérebro de animais sépticos e isso está diretamente relacionado a um desequilíbrio de enzimas antioxidantes (Barichello *et al.*, 2007).

A maneira como essas alterações agudas resultam em dano cognitivo a longo prazo é desconhecida. Uma sugestão de fatores envolvidos está representada na figura 2. O tempo de hipóxia, choque e EAS dentro da terapia intensiva parecem ser fatores relevantes. Idosos, que são aproximadamente 60% da população em UTI são mais suscetíveis e apresentam mais comorbidades como doença neurovascular que está associada à alteração neurocognitiva. A

permanência em UTI é fator desencadeante e acelerador de demência (Hopkins *et al.*, 2010).



**Figura 2:** Fatores envolvidos na fisiopatologia da encefalite associada à Sepsis partindo da inflamação sistêmica até o desenvolvimento do *delirium*. Barreira Hematoencefálica; SNC (adaptado de Miranda 2010).

Em modelos animais, a encefalopatia aguda é observada durante o curso da sepsis (Comim *et al.*, 2009), e os sobreviventes apresentam disfunção cognitiva a longo prazo (Barichello *et al.*, 2005). Esses modelos representam uma importante ferramenta para estudar os mecanismos associados à disfunção do SNC durante e depois de sepsis. A deficiência colinérgica central é hipotetizada como mecanismo principal para a ocorrência de *delirium* (van Gool *et al.*, 2010), sendo a conclusão de que se sobrepõe aos mecanismos fisiopatológicos para *delirium*, Doença de Alzheimer (DA) e neurodegeneração (Buckingham *et al.*, 2009). Assim, *delirium* e demência podem representar diferentes pontos ao longo de diversos distúrbios cognitivos.

Semmler e colaboradores (2007) demonstraram a perda neuronal em sub-regiões do hipocampo e no córtex pré-frontal e reduziu a inervação colinérgica de áreas do córtex de animais sobreviventes a sepsis - de forma semelhante à observada em pacientes com DA. Essa semelhança também foi demonstrada utilizando rivastigmina para reverter déficits cognitivos a longo prazo em animais sobreviventes sepsis (Comim *et al.*, 2009).

### 1.3.1 Marcadores da Sepses

Marcadores de danos cerebrais durante a sepsis podem ter um valor considerável no esclarecimento dos mecanismos envolvidos na sepsis e quantificar o grau de dano ao cérebro. Um estudo realizado por Larsson e colaboradores (2005) mostra, por exemplo, que a concentração plasmática da proteína S-100 $\beta$ , poderia ser utilizada como possível marcador de danos gliais, pois se encontrou aumentada em pacientes sépticos.

Doenças neurodegenerativas compartilham mecanismos comuns diretamente associados à agregação patológica de proteínas. Estes acumulam como depósitos de fibras de amiloide em regiões vulneráveis do SNC (Tillemont *et al.*, 2010). Na DA, as proteínas *tau* fosforiladas anormalmente formam os emaranhados neurofibrilares, e peptídeo beta-amiloide (A $\beta$ ) acumula-se no meio extracelular e forma placas amilóides, causando morte celular neuronal, como consequência da agregação de proteínas hidrofóbicas deformadas (Haapasalo *et al.*, 2010). Da mesma forma, estes parâmetros também são observados em pacientes que sofreram traumatismo crânio-encefálico (TCE) (Johnson *et al.*, 2010; DeKosky *et al.*, 2007; Ikonovic *et al.*, 2004). A proteína precursora de amiloide (APP) é sintetizada no citoplasma neuronal e se acumula nos axônios que sofreram dano pelo TCE (Johnson *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010a; Smith *et al.*, 2003). A APP pode ser clivada por diferentes enzimas incluindo a  $\alpha$ -secretase, prevenindo geração de A $\beta$ , ou BACE1 (do inglês,  *$\beta$ -site APP cleaving enzyme 1*).

A proteína *tau* faz parte da família das proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) (Binder *et al.*, 1985). Evidências têm demonstrado que *tau* total em líquido reflete a intensidade do dano e a degeneração axonal e neuronal. O aumento de *tau* total em líquido em doenças agudas como acidente vascular encefálico, traumatismo craniano é correlacionado positivamente com o dano tecidual e negativamente com os desfechos clínicos (Hesse *et al.*, 2001; Ost *et al.*, 2006; Zetterberg *et al.*, 2006).

Níveis aumentados de *tau* total no líquido são associados à rápida progressão do dano cognitivo (Bloom *et al.*, 2009), ao declínio cognitivo em maior velocidade e a maior mortalidade em casos de DA (Samgard *et al.*, 2009; Wallin *et al.*, 2009), logo a *tau* fosforilada verificada em líquido reflete o grau de fosforilação da proteína *tau* no SNC (Blennow *et al.*, 2012). Diversos estudos vêm mostrando que a acurácia diagnóstica para a combinação de *tau* total, *tau* fosforilada e

A $\beta$  é maior que qualquer marcador biológico sozinho (Galasko *et al.*, 1998; Riemenschneider *et al.*, 2002; Maddalena *et al.*, 2003; Zetterberg *et al.*, 2003; Hansson *et al.*, 2006).

Na DA ocorre a deposição de placas A $\beta$  no cérebro. A microglia é ativada por peptídeos A $\beta$ , que inicia a produção de EROs pela Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) oxidase. O estresse oxidativo gerado vem apresentando implicações em diversas doenças neurodegenerativas (Hardy; Selkoe, 2002; Choi *et al.*, 2012). O acúmulo de A $\beta$  acarreta alteração da fisiologia celular ocasionando dano ao metabolismo energético e respiração mitocondrial, aumentando o estresse oxidativo, neuroinflamação, falência sináptica e neurodegeneração (Caspersen *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2010; Du *et al.*, 1997; Takuma *et al.*, 2009).

A deposição excessiva de A $\beta$  ativa o NF- $\kappa$ B e induz a secreção de Oxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a COX-2, pela microglia (Kang *et al.*, 2001; Martin-Moreno *et al.*, 2011). O peptídeo A $\beta$  também é capaz de desencadear a ativação do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), o qual medeia uma variedade de danos, incluindo inflamação e dano oxidativo (Fang *et al.*, 2010; Carrano *et al.*, 2011).

RAGE tem demonstrado papel importante na DA, com um amplo repertório de ligantes, incluindo os produtos da glicação (AGEs) e A $\beta$  (Zong *et al.*, 2010). Evidências vêm demonstrando que a interação do RAGE com seu ligante (por exemplo o A $\beta$ ) é capaz de ativar múltiplas vias de sinalização intracelular incluindo p38 e MAPK (do inglês, *Mitógeno Ativador da Proteína Kinase*), SAPK/JNK (do inglês, *Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*) e NF- $\kappa$ B (Takuma *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2010; Carrano *et al.*, 2011; Deane *et al.*, 2012). Recentemente, verificou-se sua relação com uma variedade de lesões no SNC, como disfunção neuronal, amplificação da neuroinflamação, promoção de estresse oxidativo, aumento do influxo de A $\beta$  pela barreira hematoencefálica (Takuma *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2010; Carrano *et al.*, 2011; Deane *et al.*, 2012).

Estudos sugerem que a ativação de RAGE por seu ligante é capaz de gerar um *feedback* positivo entre RAGE e NF- $\kappa$ B, o que gera ciclo vicioso entre estresse oxidativo e inflamação, que cursaria com aumento de A $\beta$  e consequente ativação de NF- $\kappa$ B e então aumento da expressão de RAGE. Já o RAGE aumentado, interage com seus ligantes, induzindo a geração de EROs e ativa NF- $\kappa$ B novamente (Bierhaus *et al.*, 1997; Schmidt; Stern 2000; Yeh *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2013).

Adicionalmente, a ativação do RAGE pode ser feita pelo HMGB1, que está aumentado nos fluídos extracelulares durante a sepse, bem como por S100 $\beta$ , uma proteína relevante na disfunção do SNC (Sims *et al.*, 2010).

A família das proteínas S100 modulam uma variedade de funções intracelulares, incluindo homeostase do calcio, organização citoesquelética, progressão do ciclo celular, crescimento e diferenciação celular (Donato *et al.*, 2001; Heizmann *et al.*, 2002). Apesar de suas funções intracelulares, a liberação das S100s acontecem a partir de diferentes tipos celulares durante processos inflamatórios, podendo ser utilizadas como marcadores de atividade na doença (Frosch *et al.*, 2000; Foell *et al.*, 2004), sendo a S100 $\beta$  associada a inflamação no SNC (Foell *et al.*, 2007). Estes eventos celulares são importantes na progressão da neurodegeneração (Tan *et al.*, 2009). A resposta inata da glia ao dano, patógeno ou estímulo de ativação de maneira geral conduziria a desfechos benéficos, como a fagocitose ou produção de fatores de reparação ou proteção. No entanto, quando a ação da microglia é mantida gera superprodução de mediadores proinflamatórios alterando a homeostase, o que resulta em progressão da doença exacerbando a influencia de fatores que interferem na disfunção neuronal e na progressão da neuropatologia (Lue *et al.*, 2001; van Eldik *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2010) Diversos estudos vem demonstrando que a A $\beta$  é capaz de causar neurotoxicidade e exercer danos diretos ou indiretos no SNC, causando disfunção e morte neuronal, levando a quadros de demência.

Distúrbios psiquiátricos como autismo, esquizofrenia, transtorno bipolar e depressão, tem relação com alterações da função sináptica (Wuwongse *et al.*, 2013; Waites *et al.*, 2011; Gonzalez-Burgos *et al.*, 2011). Em pacientes depressivos observou-se perda de volume hipocampal, devido a neurogenese reduzida (Czeh; Lucassen, 2007; Neumeister *et al.*, 2005). Em modelo de estresse crônico moderado, foi verificado níveis baixos de neurogenese e de sinaptofisina (Yang *et al.*, 2011). Em modelo animal verificou-se que o aumento da expressão de proteína pre-sináptica, está relacionada a comportamento tipo depressivo (Furukawa-Hibi *et al.*, 2010).

A sinaptofisina é a proteína mais abundante da vesícula sináptica, geralmente mensurada para tentar quantificar as sinapses. Sugere-se o envolvimento da sinaptofisina na endocitose e reciclagem vesicular (Valtorta *et al.*, 2004; Daly & Ziff, 2002 ). A forma solúvel de A $\beta$  vem sendo relatada como preditora de mudança sináptica no córtex e giro frontal superior na DA (Lue *et al.*, 1999). A ausência de

imunoreatividade da sinaptofisina é relatada nas regiões que apresentam apenas a forma oligomérica de A $\beta$ , porém o mesmo não acontece com as formas fibrilar e monomérica (Ishibashi *et al.*, 2006). Sugere-se, sobre a densidade sináptica, que A $\beta$ , nas formas solúvel e oligomérica são tóxicas às sinapses (Clare *et al.*, 2010).

O imunoconteúdo de sinaptofisina na região de cortex pode ser reduzido pela  $\alpha$ -sinucleína, de forma dose-dependente (Bate *et al.*, 2012). A  $\alpha$ -sinucleína é um marcador histológico na doença de Parkinson, localizada nos terminais pré-sinápticos, regula a formação da vesícula sináptica e liberação de neurotransmissores (Cabin *et al.*, 2002; Bonini & Giasson, 2005), ainda, pode afetar a plasticidade sináptica durante o aprendizado (Clayton & George, 1998). No entanto, evidências sugerem que pequenos oligômeros da  $\alpha$ -sinucleína acumulam-se na membrana pré-sináptica e provocam degeneração sináptica na doença de Parkinson (Lee *et al.*, 2006; Kramer *et al.*, 2007; Kazantsev *et al.*, 2008). A perda das sinapses no hipocampo é uma característica de pacientes com doença de Parkinson que desenvolvem demência (Galvin *et al.*, 1999), bem como em modelo animal de  $\alpha$ -sinucleinopatia a perda neuronal é precedida por degeneração sináptica (Chung *et al.*, 2009). A patologia associada a  $\alpha$ -sinucleína acontece de forma similar a *tau* fosforilada na DA (Braak *et al.*, 2003).

Estas evidências apontam para um possível papel da doença neurodegenerativa a longo prazo na disfunção cognitiva induzida pela sepse, mas até o momento, não existem evidências capazes de confirmar a relação entre esses dois eventos.

Assim, a hipótese desta tese é que a inflamação aguda induz o aumento de A $\beta$  no cérebro de sobreviventes de sepse e isso está relacionado com o dano cognitivo de longo prazo.

### **1.3.2 Antioxidante e Metaloproteinase no tratamento da Sepse**

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas também conhecidas como matrixinas de uma família multigênica de proteases neutras dependentes de zinco (Zhang, *et al.*, 2010). As MMPs vêm se transformando em importantes enzimas reguladoras, tanto com atividade pró como anti vias inflamatórias, por resultarem em condições benéficas na regulação da defesa do hospedeiro e na doença inflamatória. São também mediadores na patologia e na regeneração do SNC e além de suas atividades benéficas apresentam também alguns efeitos adversos (Agrawal & Shukla, 2008).

A expressão das MMPs encontra-se sobre o controle de um mecanismo genético sofisticado ocorrendo por três vias principais: regulação da transcrição de genes; regulação da ativação das pró-enzimas e inibição pela ação dos inibidores específicos de MMPs (TIMP), por estes fatores, a degradação da matriz extracelular (MEC) está diretamente relacionada com o equilíbrio entre a produção, ativação e inibição que impedem a proteólise excessiva da MEC (Yong *et al.*, 1998; Nagase *et al.*, 2006).

O controle da expressão gênica das MMP é dado em resposta a estímulos de citocinas (IL-1, IL-4, IL-6 e TNF  $\alpha$ ) e EROs, NO, hormônios e fatores de crescimento, que se ligam a receptores na superfície da célula desencadeando cascatas de sinalização intracelulares ativando fatores de transcrição que se ligam às regiões responsivas presentes no promotor de genes de diferentes MMPs (Sun, 2010).

No que se refere à formação de EROs, pode-se dizer que em condições fisiológicas normais do metabolismo aeróbico o  $O_2$ , sobre redução tetravalente com aceitação de 4 elétrons forma água. Durante este processo são formados intermediários reativos como superóxido,  $H_2O^{\cdot -}$ , H e o  $H_2O_2$ . Normalmente, a redução completa do  $O_2$  ocorre na mitocôndria e a reatividade de EROs é neutralizada pela entrada dos 4 elétrons. Entre as espécies reativas de oxigênio formando o radical superóxido, ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzida durante a atuação máxima de neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos (Ferreira *et al.*, 1997, Cuzzocrea *et al.*, 2001). O radical peróxido reage com alvos biológicos sendo que o efeito nos tecidos é resultado da formação secundária de novos radicais livres em adição e reação do superóxido com lipídeos, catecolaminas e DNA (Marcatu *et al.*, 2000, Dix *et al.*, 1996).

Entre as EROs, o oxigênio *singlet* é a forma mais citada do oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados na última camada, é reconhecido como possível contribuinte para o estresse oxidativo nos sistemas vivos, altamente energéticos e mutagênicos, sendo capaz de oxidar moléculas biológicas (Cuzzocrea *et al.*, 2001, Bozza *et al.*, 2013).

O  $H_2O_2$  é capaz de atravessar camadas lipídicas podendo reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro, sendo assim altamente tóxicas para as moléculas podendo ser aumentada a toxicidade na presença de ferro (Eaton, 1991). A liberação de ferro intracelular diminui a capacidade liquórica de ligação de ferro-proteína e a deficiência de enzimas antioxidantes no SNC ampliam o risco de

lesões induzidas pelo trauma com a liberação de ferro. Estas espécies reativas são capazes de reagir indiscriminadamente com qualquer tipo de molécula orgânica extraindo elétrons e gerando novos radicais livres em reação em cadeia altamente citotóxicas (Cuzzocrea *et al.*, 2001, Ferreira *et al.*, 1997).

Quando existe o aumento na produção ou diminuição das defesas oxidantes acontece o *estresse oxidativo*, em que os radicais livres em excesso começam a produzir danos a lipídeos, proteínas, DNA e carboidratos, inibição das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, inativação de gliceroldeído-3-fosfato hidrogenase, inibição da atividade ATPase na membrana sódio-potássio e inativação do cálcio na membrana (Cuzzocrea *et al.*, 2001).

Intervenções que reduzem a produção de EROs exercem efeitos benéficos em diversos modelos de endotoxinas e choque séptico. Estas intervenções incluem a N-acetilcisteína (NAC)  $\alpha$ -tocoferol, alopurinol, deferoxamina (DFX), catalase, superóxido dismutase, miméticos de superóxido dismutase e tempol (Atis *et al.*, 2006, Durante *et al.*, 2004, Xiang *et al.*, 2003, Matejovic *et al.*, 2005).

NAC é a precursora artificial de glutatona, é utilizada clinicamente como droga mucolítica e no tratamento de intoxicação por paracetamol. É um *scavenger* de peróxido de hidrogênio, ácido hipocórico e radical hidroxil e por estas ações inibe a liberação de NTF 2 e a ativação de citocinas pro-inflamatórias e apoptose celular (Sprong *et al.*, 1998).

Segundo Barichello (2005), evidências sugerem que a expressão de TNF- $\alpha$  é controlado pela transcrição de NF-kB cuja atividade pode ser induzida pelo peróxido de hidrogênio. NAC mostrou inibir a atividade de NF-kB em várias linhagens celulares inclusive em macrófagos peritoniais em ratos.

O peróxido de hidrogênio, direta ou indiretamente, através de sua redução do radical hidroxil via reação de Fenton, age como um mensageiro na síntese e ativação de mediadores inflamatórios. O NAC como limpador destes radicais mostrou inibir a liberação destes mediadores (Sprong *et al.*, 1998).

O DFX é um quelante de ferro empregado em várias doenças hematológicas. Já existem estudos que mostram que a droga diminui a injúria oxidativa quando usada antes e não depois da indução da sepse melhorando a mortalidade (Messaris *et al.*, 2004).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar marcadores de neurodegeneração em cérebro de ratos sobreviventes a sepse e sua relação com dano cognitivo a longo prazo.

### 2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o imunocontéudo de sinaptofisina no hipocampo e no cortex pré-frontal em ratos sobreviventes ao modelo de sepse, por Ligação cecal e punção (CLP), 30 dias após a indução;

Avaliar tau fosforilada no hipocampo e no cortex pré-frontal em ratos sobreviventes ao modelo de sepse, por Ligação cecal e punção (CLP), 30 dias após a indução;

Avaliar  $\alpha$ -sinucleína no hipocampo e no cortex pré-frontal em ratos sobreviventes ao modelo de sepse, por Ligação cecal e punção (CLP), 30 dias após a indução;

Avaliar  $A\beta$  no hipocampo e no cortex pré-frontal em ratos sobreviventes ao modelo de sepse, por Ligação cecal e punção (CLP), 30 dias após a indução;

Avaliar S100 $\beta$  no hipocampo e no cortex pré-frontal em ratos sobreviventes ao modelo de sepse, por Ligação cecal e punção (CLP), 30 dias após a indução;

Avaliar RAGE no hipocampo e no cortex pré-frontal em ratos sobreviventes ao modelo de sepse, por Ligação cecal e punção (CLP), 30 dias após a indução.

Avaliar do imunocontéudo de sinaptofisina no hipocampo e no cortex pré-frontal em ratos sobreviventes ao modelo de sepse após o tratamento com inibidor de MMP e antioxidantes (NAC e DFX).

Avaliar  $A\beta$  no hipocampo e no cortex pré-frontal em ratos sobreviventes ao modelo de sepse após o tratamento com inibidor de MMP e antioxidantes (NAC e DFX).

Correlacionar os níveis de sinaptofisina e  $A\beta$  com desempenho no teste de esQUIVA inibitória em ratos sobreviventes ao modelo de sepse por CLP, 30 dias após a indução.

### 3. METODOLOGIA

**Experimento 01:** Determinação da presença de biomarcadores de neurodegeneração em animais sobreviventes à sepse.

a) Indução de sepse por CLP com posterior avaliação dos níveis de A $\beta$ , RAGE, *tau* fosforilada,  $\alpha$ -sinucleína, S100B e sinaptofisina;

**Experimento 02:** Determinação da relação entre níveis de beta-amilóide e sinaptofisina com alterações cognitivas em longo prazo.

a) Indução de sepse por CLP com posterior avaliação dos níveis de beta amiloide e sinaptosifina e sua relação com a performance na tarefa de isquiva inibitória

**Experimento 03:** Avaliação da efetividade do tratamento com antioxidantes ou inibidor de metaloproteinase sobre níveis de beta-amilóide e sinaptofisina e sobre as alterações cognitivas em longo prazo.

a) Indução de Sepse – Modelo de CLP, com posterior avaliação de A $\beta$  e Sinaptofisina do grupo CLP que receberam antioxidantes ou inibidor da metaloproteinase;

b) Teste de esquivia inibitória com animais que receberam antioxidantes ou inibidor da metaloproteinase.

#### 3.1 Descrição do Experimento 01: Avaliação de biomarcadores de neurodegeneração em animais sobreviventes a sepse

##### 3.1.1 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos, entre 2 e 3 meses de idade, pesando aproximadamente 350 g, procedentes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram acondicionados com 5 animais por caixa, ciclo de claro e escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de 23 + 1°C.

Os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) para pesquisa utilizando animais. Todos os protocolos realizados foram aprovados pelo comitê de ética em animais da UNESC, com aprovação sob nº 047/2009 CEUA/Unesc.

Durante os experimentos, os animais foram manipulados por pessoas qualificadas, para tratar esses animais de maneira humanitária evitando dores e estresse desnecessários a estes animais. Quando houve indicação, ou ao final dos experimentos, os animais foram devidamente sacrificados sob estrita obediência às prescrições científicas.

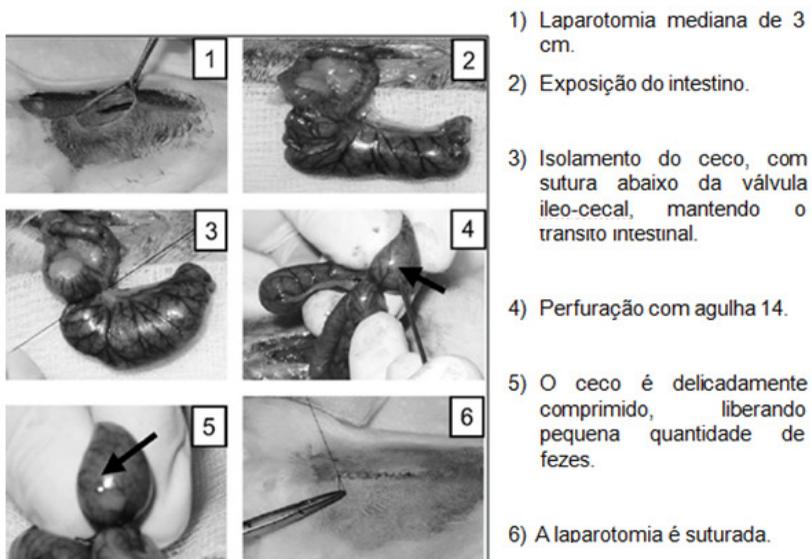
### **3.1.2 Indução de Sepses – Modelo de ligação e perfuração cecal (CLP)**

Sepses intra-abdominal foi induzida usando a técnica de CLP conforme previamente descrito (Witchterman *et al.*, 1980) com adaptações (Ritter *et al.*, 2003). Brevemente, os ratos foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg), por via intraperitoneal, sendo submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal. O ceco foi exposto e ligado logo abaixo da junção íleo-cecal com fio seda 3-0, mantendo assim a continuidade intestinal. O ceco foi perfurado com uma agulha número 14 na face antimesentérica do ceco, e gentilmente comprimido até extrusão de conteúdo fecal. Os planos cirúrgicos foram fechados e os ratos observados em caixa de recuperação por 2 horas.

Como controle, foram utilizados animais submetidos a laparotomia, com manipulação do ceco, mas sem ligação ou perfuração (*sham*) conforme Figura 03. Os grupos sepses e *sham* receberam reposição volêmica, realizada com salina, 50 mL/kg, imediatamente e 12 horas após a cirurgia. Após o procedimento cirúrgico os animais receberam suporte básico de antibióticos (ceftriaxona 30 mg/kg e clindamicina 25 mg/kg) a cada 6 horas por 3 dias. A sobrevivência em 7 dias foi de 100% no grupo *sham* e 43% no grupo sepses, bem como a sobrevivência após 30 dias, em concordância com estudos prévios (Ritter *et al.*, 2003). Ao fim dos procedimentos os animais voltaram às caixas com livre acesso a água e comida. Os animais foram distribuídos de forma randomizada entre grupos *sham* e sepses.

Trinta dias após o procedimento cirúrgico os animais foram mortos por decapitação e isolados hipocampo e cortex pré-frontal (n=15 por grupo).

### Ligação Cecal e Perfuração (CLP)



**Figura 3:** Ligação cecal e Perfuração (CLP), adaptado de Wichterman, Baue, Chaudry (1980).

#### 3.1.3 Análise por *Western Blot*

Os níveis de  $A\beta$ , RAGE, *tau* fosforilada,  $\alpha$ -sinucleína, S100B e sinaptofisina foram mensurados por Western blot utilizando anticorpos específicos. 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 (30  $\mu$ g/poço) foram fracionadas 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 anticorpo diluído em TTBS (1:1000 – anti-RAGE, R5278, Sigma; anti-  $A\beta$ , No. 2454; anti-sinaptofisina, No. 5461, Cell Signaling Technology; anti-isoforma de *tau* de Doença de Alzheimer, A8855,

Sigma; anti- $\alpha$ -sinucleína, ab6162, Abcam; anti-S100B, ab41548, Abcam, anti- $\tau$ , A8855, Sigma). Anticorpo secundário Anti-IgG de coelho ou rato (de acordo com as espécies que originaram o anticorpo primário) foi incubado com as membranas durante 2 horas em temperatura ambiente (diluição: 1:5000), a membrana foi lavada novamente e a imunorreatividade foi detectada por quimioluminescência utilizando o kit Pierce WestPico Chemiluminescence. A análise densitométrica dos filmes foi realizada com o software ImageQuant. Todos os resultados foram expressos como uma razão relativa entre A $\beta$ , RAGE e sinaptofisina e o imunoc conteúdo de proteína  $\beta$ -actina.

### **3.1. 4 Análise Estatística**

Os resultados do *immunoblotting* são expressos como a média  $\pm$  DP (desvio-padrão). As diferenças entre os grupos foram comparados pelo teste t. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o SPSS 12.0 para Windows® e foi atribuída significância estatística quando  $p < 0,05$ .

## **3.2 Descrição do Experimento 02: Determinação dos níveis de A $\beta$ e sinaptofisina com alterações cognitivas a longo prazo.**

### **3.2.1 Animais**

Os procedimentos adotados foram os mesmos dos animais do experimento 01.

### **3.2.2 Indução de Sepsis – Modelo de ligação e perfuração cecal (CLP)**

Os procedimentos adotados foram os mesmos dos animais do experimento 01.

### **3.3.3 Análise por Western Blot**

Os procedimentos adotados foram os mesmos dos animais do experimento 01 limitado apenas a dosagem de beta-amiloide e sinaptofisina por apresentarem no experimento 01 o aumento mais significativo.

### 3.2.3 Teste de esquiva inibitória

Para realização de tal avaliação usou-se uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal (1mm de diâmetro). Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento é colocada junto à parede esquerda do aparelho. Na sessão de treino, os animais são colocados sobre a plataforma e mede-se o tempo que o animal leva para descer com as quatro patas da plataforma. Esse tempo é denominado latência. Imediatamente após descer da plataforma (com as 4 patas), o animal recebe um choque de 0,4 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal é novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele leva para descer (latência), porém não é administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Os intervalos entre o treino e o teste foram de 24 horas para medir memória de longa duração (Izquierdo, *et al.*, 1998, Quevedo, *et al.*, 1999).



**Figura 4:** Esquiva Inibitória (treino simples). Imagem disponibilizada pelo Laboratório de Neurociências/UNESC.

### 3.3 Descrição do experimento 03: Avaliação da efetividade do tratamento com antioxidantes ou inibidor de metaloproteinase

**sobre níveis de beta-amilóide e sinaptofisina e sobre as alterações cognitivas em longo prazo.**

### **3.3.1 Animais**

Os procedimentos adotados foram os mesmos dos animais do experimento 01.

### **3.3.2 Indução de Sepse – Modelo de ligação e perfuração cecal (CLP)**

Os procedimentos adotados foram os mesmos dos animais do experimento 01 com exceção de que alguns animais foram tratados imediatamente após a indução da sepse com antioxidantes (N-acetilcisteína, 20 mg/kg a cada 6 horas por 24 horas e uma única dose de deferoxamina 20 mg/kg ambas subcutâneo) ou com inibidor de metaloproteinase 2-9 (inibidor I – Santa Cruz Biotecnologia - 0,3 mg/kg, injetado como uma única dose no ventrículo cerebral com auxílio de um estereotáxico) (n = 15 por grupo).

### **3.3.3 Análise por *Western Blot***

Foi utilizada a mesma técnica do experimento 01.

### **3.3.4 Teste de esQUIVA inibitória**

Os procedimentos adotados foram os mesmos dos animais do experimento 02.

### **3.3.5 Análise Estatística**

Os dados obtidos pelo teste de esQUIVA inibitória foram comparados pelo teste Mann-Whitney. A análise inter-grupos foi realizada pelo teste Wilcoxon. Para análise dos efeitos dos tratamentos sobre os níveis de marcadores de neurodegeneração e a performance na esQUIVA inibitória foi realizado teste de ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o *SPSS 12.0* para *Windows*® e foi atribuída significância estatística quando  $p < 0,05$ .

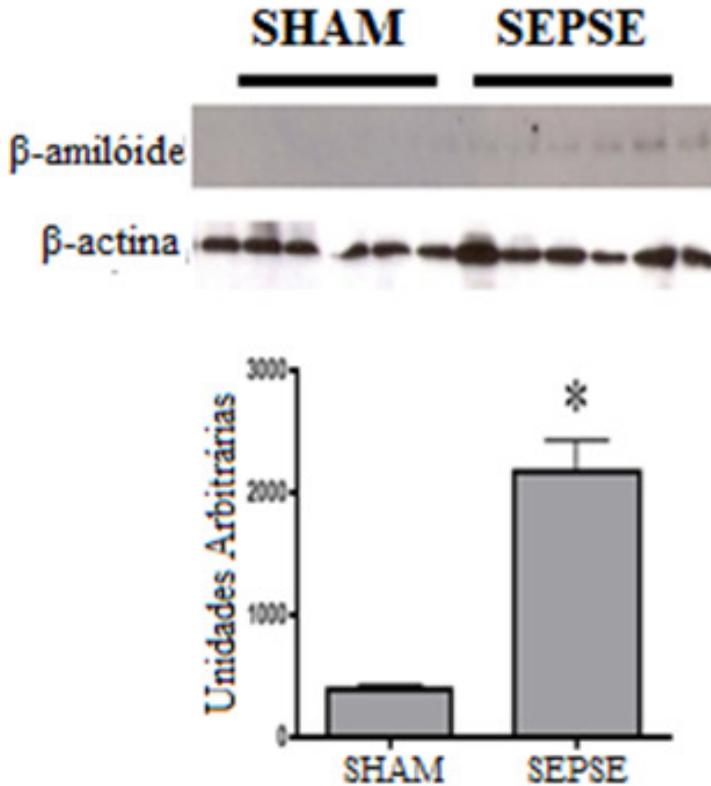
## **4. RESULTADOS**

Os resultados serão apresentados em três momentos: Resultados do Experimento 01, Resultados do Experimento 02 e Resultado do Experimento 03:

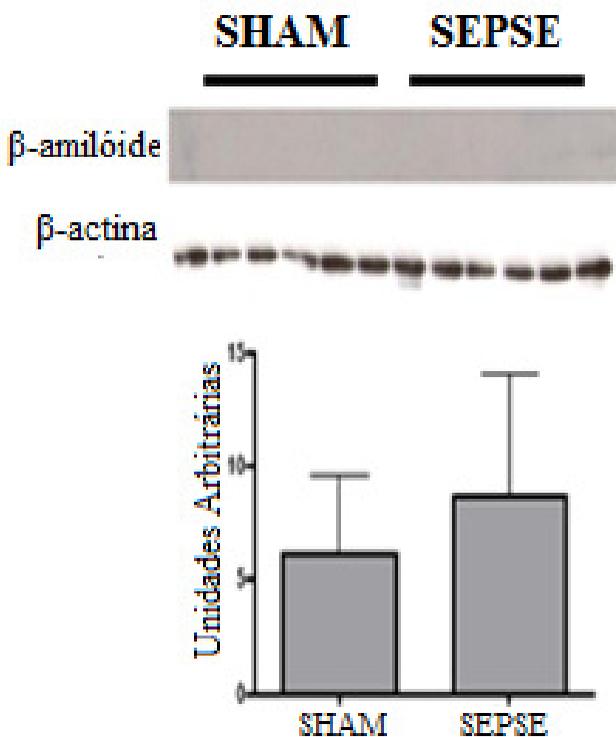
### **4.1 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 01**

#### **4.1.1 Avaliação do imunoconteúdo de A $\beta$ , RAGE e sinaptofisina em hipocampo e cortex pré-frontal**

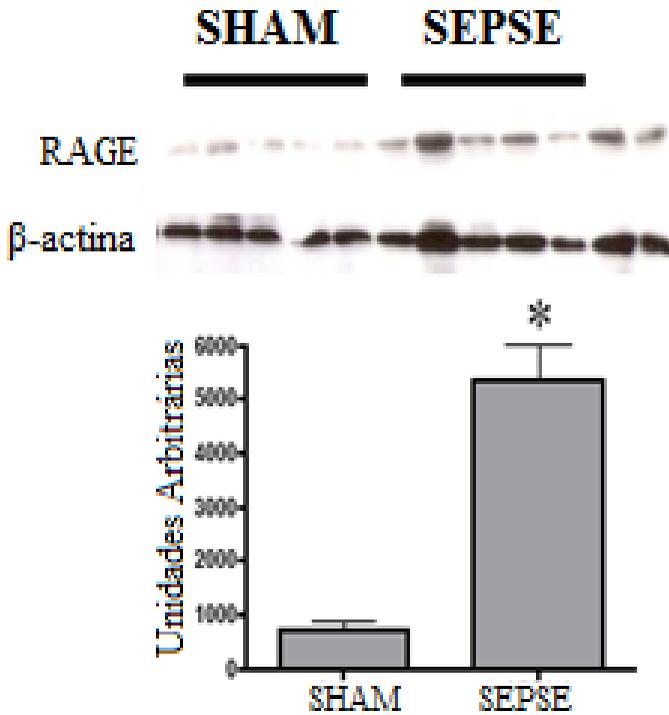
Quando comparado ao grupo *sham*, o imunoconteúdo de A $\beta$  esteve significativamente aumentado no hipocampo (Figura 5) no grupo seps, mas não no córtex pré-frontal (Figura 6). Houve aumento da expressão de RAGE no hipocampo e no córtex pré-frontal do grupo seps (Figuras 7 e 8), comparado ao *sham*. Ainda, o imunoconteúdo de sinaptofisina diminuiu apenas no córtex pré-frontal do grupo seps (Figuras 9 e 10).



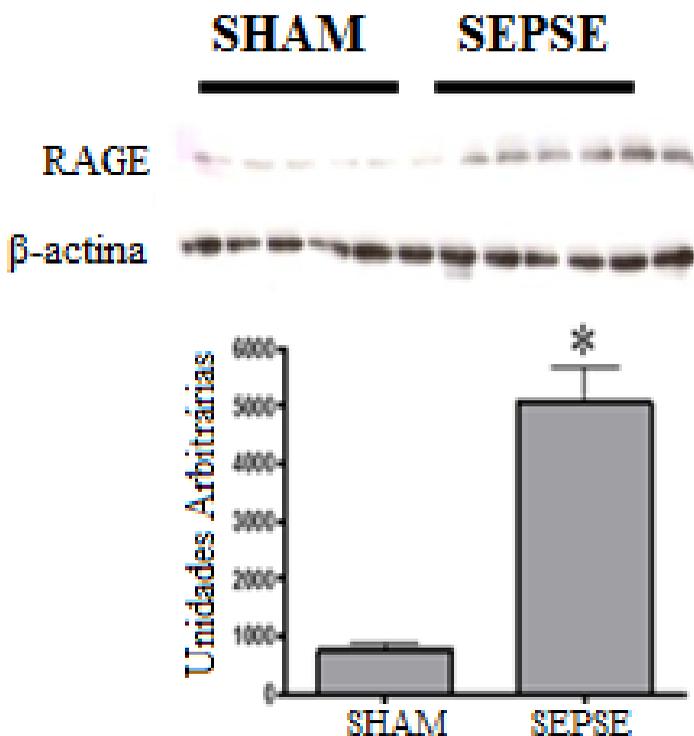
**Figura 5:** Imunoconteúdo de A $\beta$  em hipocampo de animais sobreviventes a sepse. Imunoblot é representado por amostras individuais de diferentes animais do grupo *sham* ou sepse. Os gráficos de colunas representam a média  $\pm$  DP, normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ -actina. As amostras foram analisadas utilizando o teste t e \*demonstra diferença significativa entre os grupos sham e sepse ( $p < 0,05$ ),  $n = 15$  por grupo.



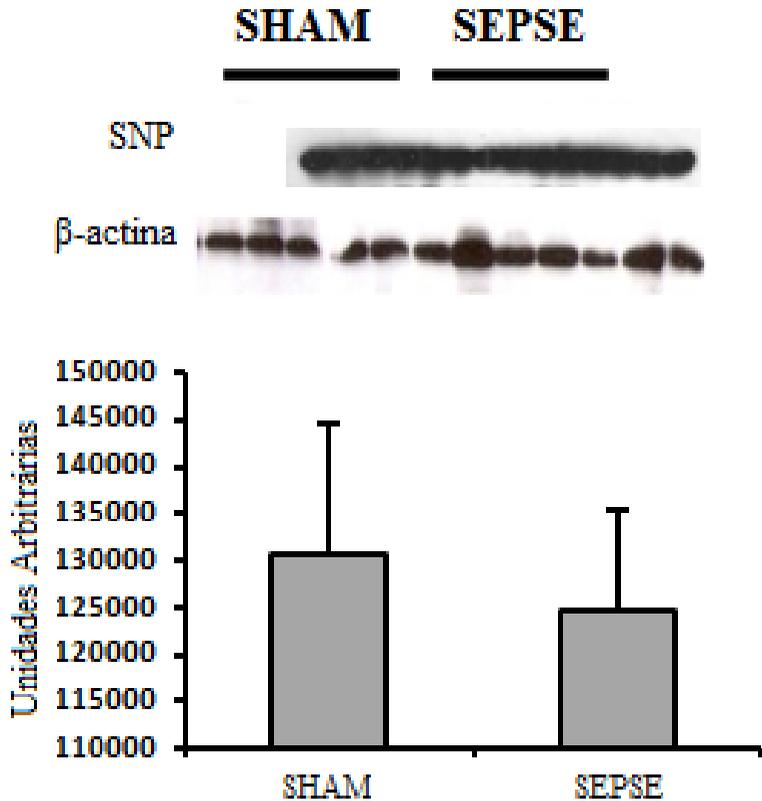
**Figura 6:** Imunoconteúdo de A $\beta$  em córtex pré-frontal de animais sobreviventes a sepse. Imunoblot é representado por amostras individuais de diferentes animais do grupo sham ou sepse. Os gráficos de colunas representam a média  $\pm$  DP, normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ -actina. As amostras foram analisadas utilizando o teste t. n=15 por grupo.



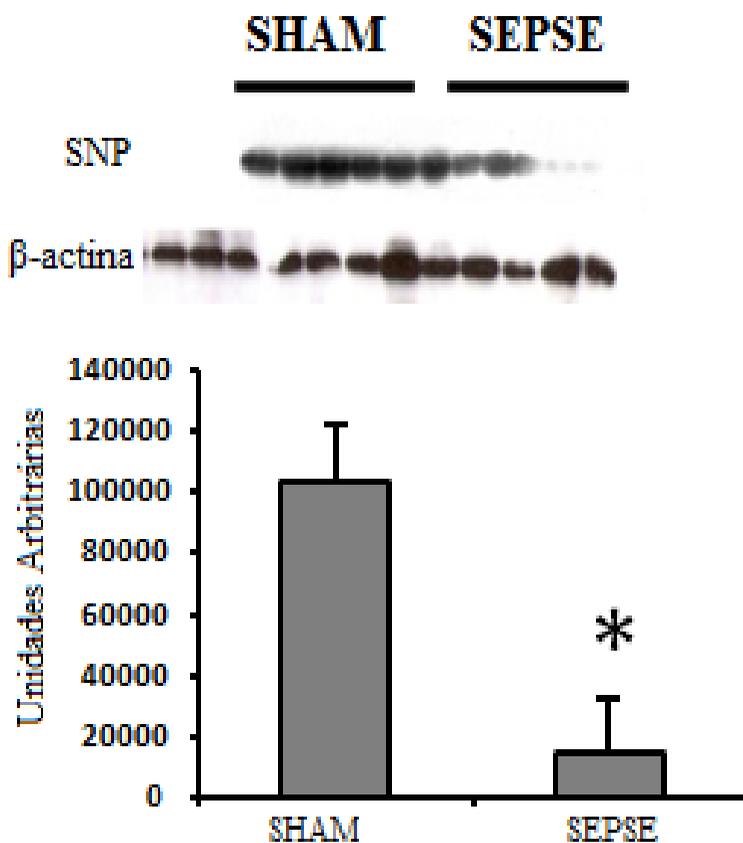
**Figura 7:** Imunoconteúdo de RAGE em hipocampo de animais sobreviventes a sepse. Imunoblot é representado por amostras individuais de diferentes animais do grupo sham ou sepse. Os gráficos de colunas representam a média  $\pm$  DP, normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ -actina. As amostras foram analisadas utilizando o teste t e \*demonstra diferença significativa entre os grupos sham e sepse ( $p < 0,05$ ),  $n = 15$  por grupo.



**Figura 8:** Imunoconteúdo de RAGE em córtex pré-frontal de animais sobreviventes a sepse. Imunoblot é representado por amostras individuais de diferentes animais do grupo sham ou sepse. Os gráficos de colunas representam a média  $\pm$  DP, normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ -actina. As amostras foram analisadas utilizando o teste t e \*demonstra diferença significativa entre os grupos sham e sepse ( $p < 0,05$ ),  $n = 15$  por grupo.



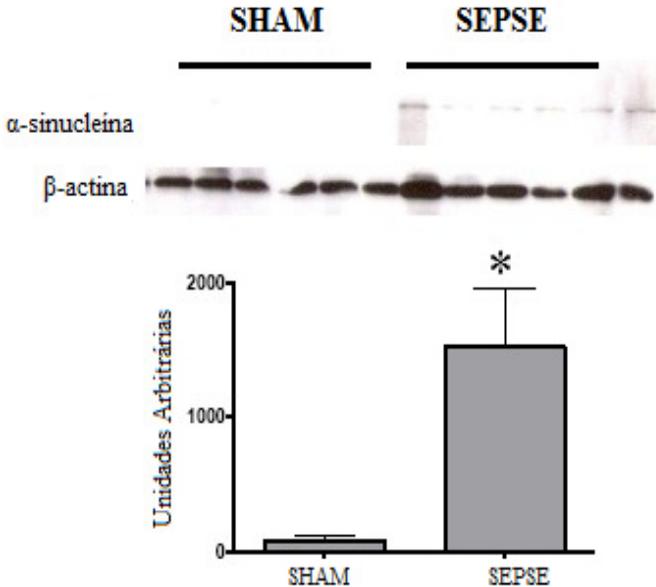
**Figura 9:** Imunoconteúdo de sinaptofisina em hipocampo de animais sobreviventes a sepse. Imunoblot é representado por amostras individuais de diferentes animais do grupo sham ou sepse. Os gráficos de colunas representam a média  $\pm$  DP, normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ -actina. As amostras foram analisadas utilizando o teste t, n=15 por grupo. SNP=sinaptofisina.



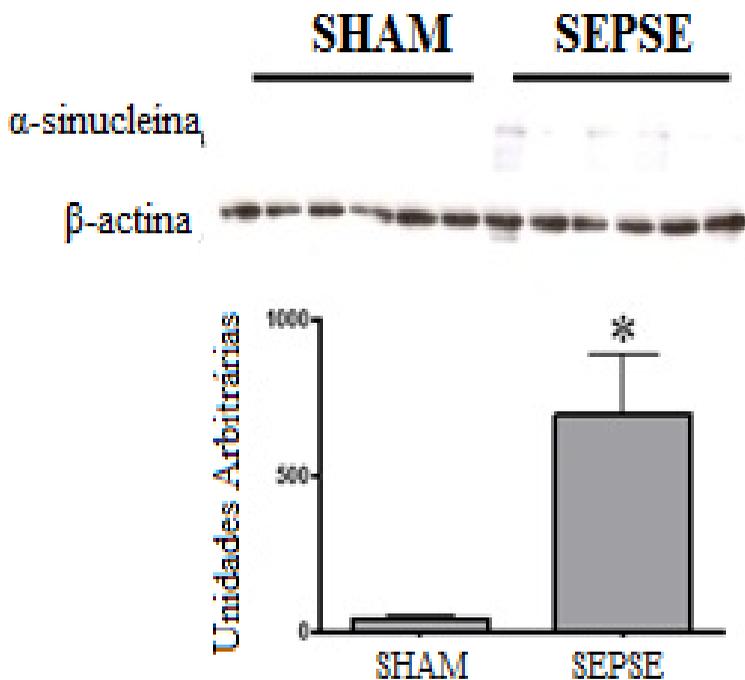
**Figura 10:** Imunoconteúdo de sinaptofisina em córtex pré-frontal de animais sobreviventes a sepse. Imunoblot é representado por amostras individuais de diferentes animais do grupo sham ou sepse. Os gráficos de colunas representam a média  $\pm$  DP, normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ -actina. As amostras foram analisadas utilizando o teste t e \*demonstra diferença significativa entre os grupos sham e sepse ( $p < 0,05$ ),  $n = 15$  por grupo. SNP=sinaptofisina.

#### 4.1.2 Avaliação do imunoconteúdo de $\alpha$ -sinucleína, tau fosforilada e S100 $\beta$ em hipocampo e cortex pré-frontal

Em hipocampo e cortex pré-frontal de animais do grupo sepse o imunoconteúdo de  $\alpha$ -sinucleína foi significativamente maior comparado ao *sham* (Figuras 11 e 12 ).

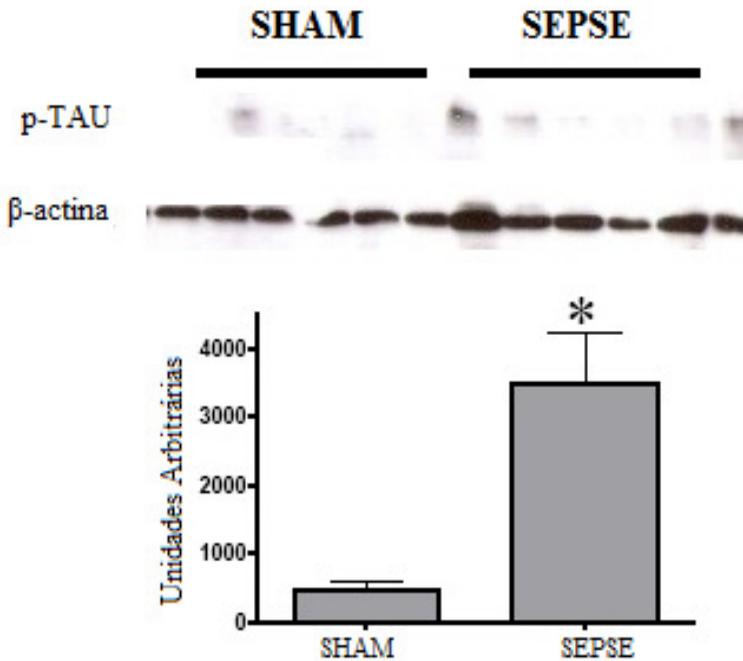


**Figura 11:** Imunoconteúdo de  $\alpha$ -sinucleína em hipocampo de animais sobreviventes a sepse. Imunoblot é representado por amostras individuais de diferentes animais do grupo sham ou sepse. Os gráficos de colunas representam a média  $\pm$  DP, normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ -actina. As amostras foram analisadas utilizando o teste t e \*demonstra diferença significativa entre os grupos sham e sepse ( $p < 0,05$ ),

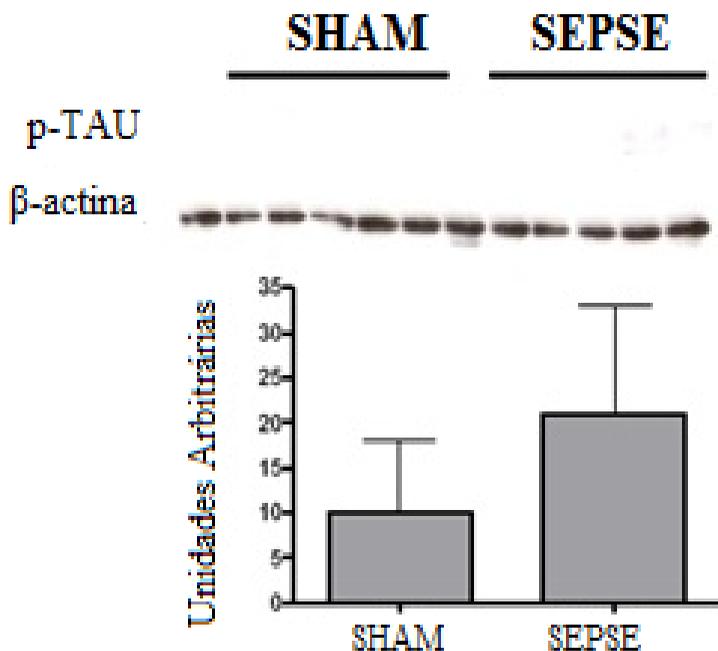


**Figura 12:** Imunoconteúdo de  $\alpha$ -sinucleína em córtex pré-frontal de animais sobreviventes a sepse. Imunoblot é representado por amostras individuais de diferentes animais do grupo sham ou sepse. Os gráficos de colunas representam a média  $\pm$  DP, normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ -actina. As amostras foram analisadas utilizando o teste t e \*demonstra diferença significativa entre os grupos sham e sepse ( $p < 0,05$ ),

O imunoconteúdo de *tau* fosforilada, determinado pela utilização de um anticorpo desenvolvido para detectar a isoforma de *tau* predominante no tecido cerebral de pacientes com DA - “AD-like tau”-, também foi maior no hipocampo do grupo sepse (Figura 13), porém no cortex pré-frontal (Figura 14) não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

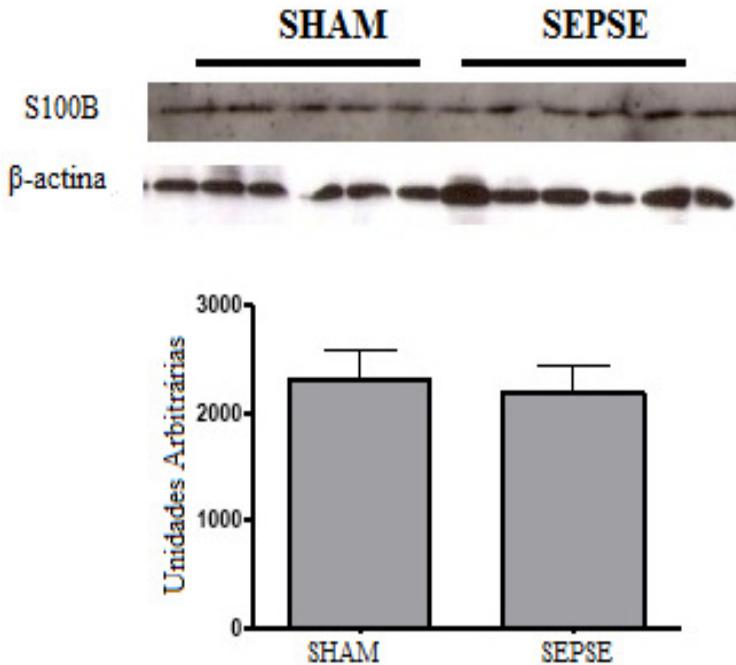


**Figura 13:** Imunoconteúdo de tau fosforilada em hipocampo de animais sobreviventes a sepse. Imunoblot é representado por amostras individuais de diferentes animais do grupo sham ou sepse. Os gráficos de colunas representam a média  $\pm$  DP, normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ -actina. As amostras foram analisadas utilizando o teste t e \*demonstra diferença significativa entre os grupos sham e sepse ( $p < 0,05$ ),

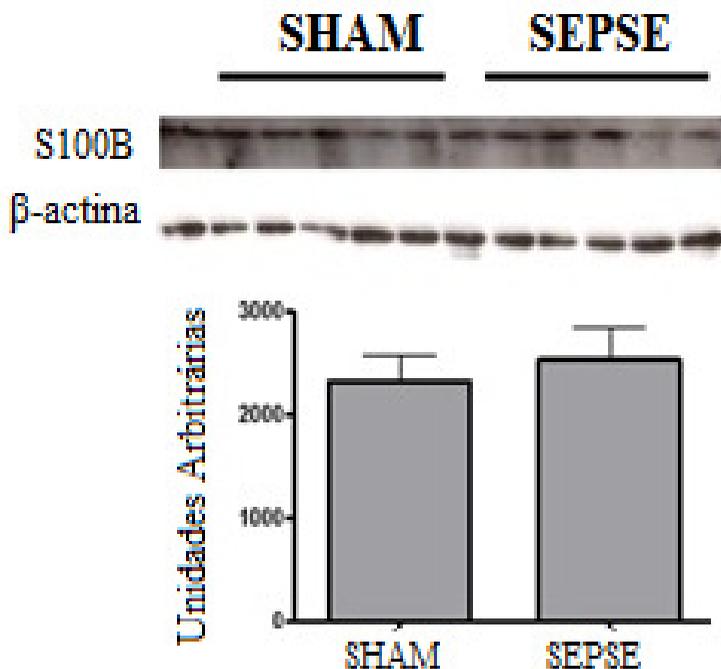


**Figura 14:** Imunoconteúdo de tau fosforilada em córtex pré-frontal de animais sobreviventes a sepse. Imunoblot é representado por amostras individuais de diferentes animais do grupo sham ou sepse. Os gráficos de colunas representam a média  $\pm$  DP, normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ -actina. As amostras foram analisadas utilizando o teste t ( $p < 0,05$ ),

Animais dos grupos sham e sepse apresentaram imonoconteúdo se S100 $\beta$  semelhantes em hipocampo e cortex pré-frontal (Figuras 15 e 16).



**Figura 15:** Imunoconteúdo de S100 $\beta$  em hipocampo de animais sobreviventes a sepse. Imunoblot é representado por amostras individuais de diferentes animais do grupo sham ou sepse. Os gráficos de colunas representam a média  $\pm$  DP, normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ -actina. As amostras foram analisadas utilizando o teste t e ( $p < 0,05$ ),



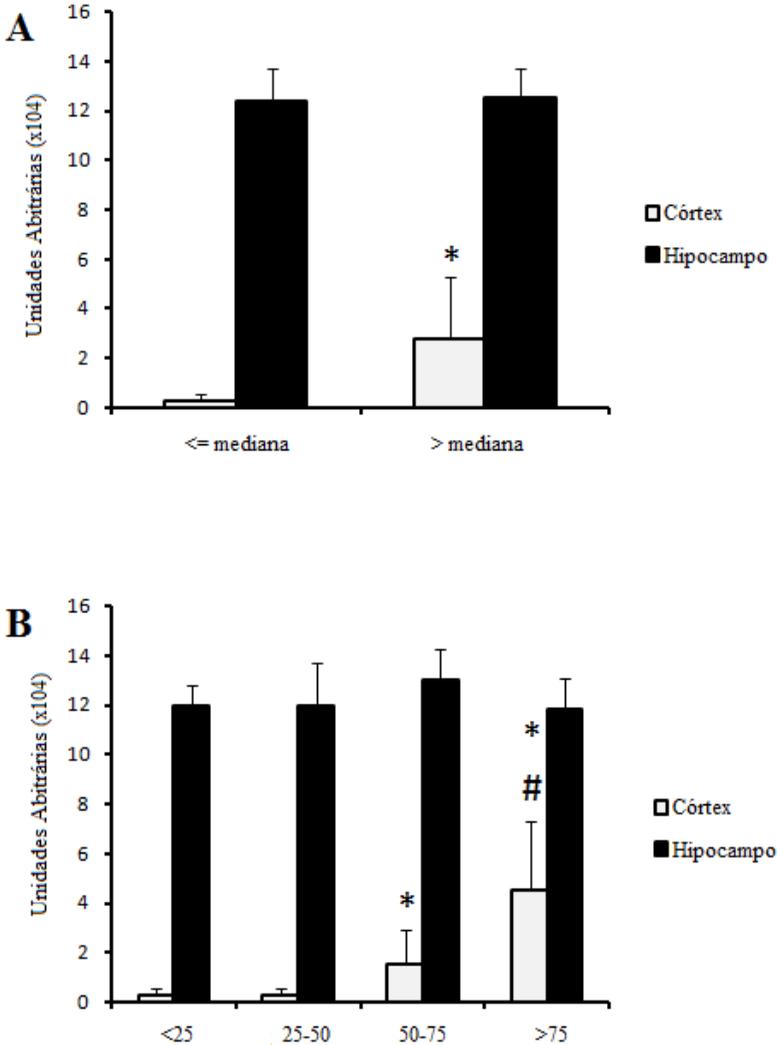
**Figura 16:** Imunoconteúdo de S100β em córtex pré-frontal de animais sobreviventes a sepse. Imunoblot é representado por amostras individuais de diferentes animais do grupo sham ou sepse. Os gráficos de colunas representam a média  $\pm$  DP, normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ -actina. As amostras foram analisadas utilizando o teste t ( $p < 0,05$ ),

## 4.2 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 02

### 4.2.1 Determinação da relação entre níveis de beta-amilóide e sinaptofisina com alterações cognitivas em longo prazo.

A latência na esQUIVA inibitória no teste, foi significativamente reduzida no grupo sepse, quando comparado com o grupo *sham*, sugerindo dano na memória aversiva. Quando os animais do grupo sepse foram divididos de acordo com as medianas do teste, observou-se que o pior desempenho foi associado com baixos níveis de sinaptofisina no córtex pré-frontal (Figura 17A), mas a mesma relação não foi observada para imunoconteúdo de A $\beta$  ou RAGE (dados não mostrados). Quando o desempenho da esQUIVA inibitória foi classificado de acordo com os

quartis da relação de sinaptofisina e córtex pré-frontal e desempenho parece adquirir uma "dose-resposta" (Figura 17B). Além disso, os níveis de sinaptofisina e  $A\beta$  no córtex pré-frontal foram inversamente correlacionados ( $R^2 = 0,49, p < 0,001$ ).



**Figura 17:** Desempenho no teste de esQUIVA inibitória relacionado aos níveis de sinaptofisina no córtex pré-frontal. O desempenho no teste de esQUIVA inibitória foi relacionada com os níveis de sinaptofisina, dividindo de acordo com a

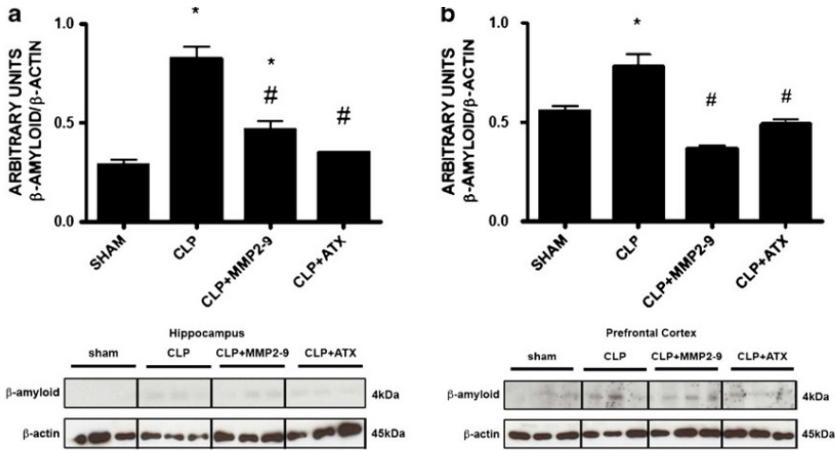
mediana da latencia na sessão teste (A), ou pelos quartis da latencia na sessão teste (B). Os grupos sepse são apresentados em gráficos de colunas, representando a média  $\pm$  DP de sinaptofisina, normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ -actina. Os dados foram analisadas utilizando o teste t ou ANOVA e \* demonstra diferença significativa em relação a  $\leq$ mediana ou quartil  $< 25$ , #demonstra diferença em relação ao quartil 50-75 ( $p < 0,05$ ),  $n=15$  por grupo.

### **4.3 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 03**

#### **4.3.1 Avaliação do imunoconteúdo de A $\beta$ e tratamento com inibidor de MMP e Antioxidantes (ATX)**

Quando comparado o imunoconteudo de A $\beta$  do grupo *sham* com o grupo CLP no hipocampo e cortex percebe-se um aumento significativo em ambos. Quando comparados imunoconteudo de A $\beta$  do grupo CLP com CLP+MMP2-9 e ATX no hipocampo e cortex, percebe-se uma redução significativa do imunoconteudo de A $\beta$  em ambos.

**Hipocampo**  
**Córtex Pré-frontal**



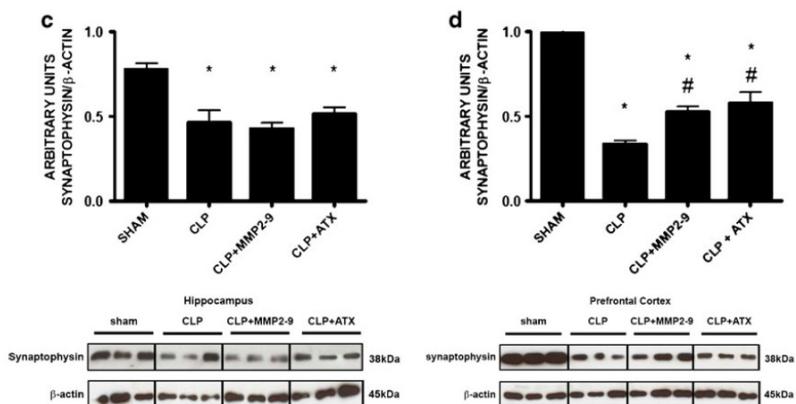
**Figura 18:** Imunoconteúdo de A $\beta$  no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais sobreviventes a sepse. Immunoblot é representado por as mostras individuais de diferentes animais do grupo *sham*, grupo sepse, grupo animais tratados com MMP2-9 e animais tratados com ATX. Os gráficos de coluna representam a média  $\pm$  DP normalizados por imunoconteúdo de A $\beta$ . As amostras foram analisadas utilizando por ANOVA e \* demonstra diferenças significativas comparando com o grupo sham e # a diferença significativa comparando com o grupo sepse ( $p < 0,05$ ),  $n = 15$  por grupo.

#### 4.3.2 Avaliação do imunoconteúdo de Sinaptofisina e tratamento com inibidor de MMP e ATX

Quando comparado o imunoconteúdo de Sinaptofisina do grupo *sham* com o grupo CLP no hipocampo e córtex percebe-se uma redução significativa em ambos. Quando comparados imunoconteúdo de Sinaptofisina do grupo CLP com CLP+MMP2-9 e ATX no hipocampo não se percebe alterações significativas porém, no córtex, percebe-se um aumento do imunoconteúdo de sinaptofisina após tratamento com MMP2-9 e ATX.

**Hipocampo**  
Pré-frontal

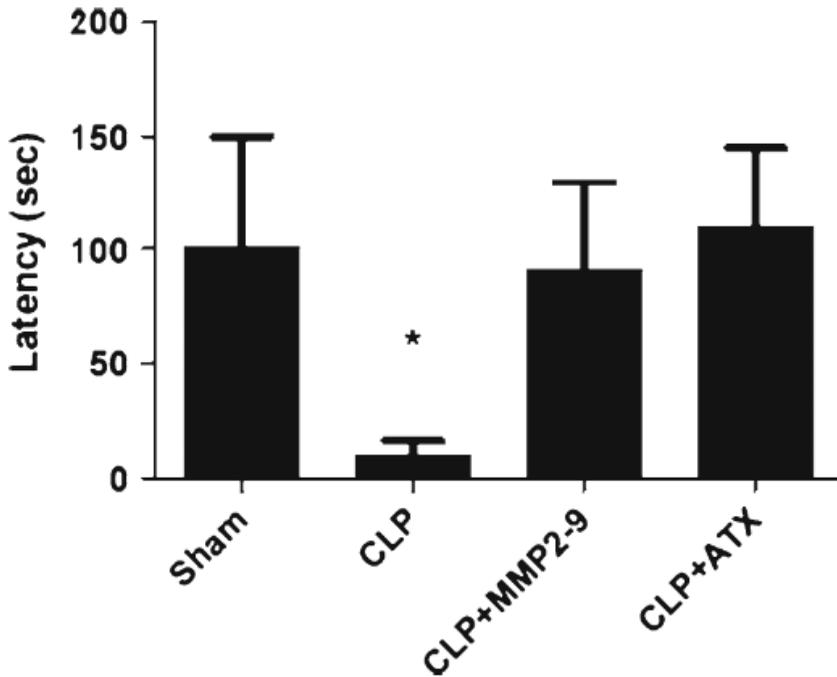
**Córtex**



**Figura 19:** Imunoconteúdo de Sinaptofisina no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais sobreviventes a sepse. Immunoblot é representado por a mostras individuais de diferentes animais do grupo *sham*, grupo sepse, grupo animais tratados com MMP2-9 e animais tratados com ATX. Os gráficos de coluna representam a média  $\pm$  DP normalizados por imunoconteúdo de  $\beta$ . As amostras foram analisadas utilizando por ANOVA e \* demonstra diferenças significativas comparando com o grupo sham e # a diferença significativa comparando com o grupo sepse ( $p < 0,05$ ),  $n = 15$  por grupo.

### 4.2.3 Teste de comportamento

A latência na esQUIVA inibitória no teste foi significativamente reduzida no grupo sepse, quando comparado com o grupo *sham*, sugerindo dano na memória aversiva, como já demonstrado. Quando os animais do grupo sepse foram tratados com inibidor de MMP2-9 ou ATX, observou-se a melhora do desempenho da mem( Figura 20).



**Figura 20:** Prevenção do déficit cognitivo a longo prazo em animais sobreviventes a sepse por tratamento com ATX ou inibidor de MMP2-9. Sepse foi induzida nos animais tratados ou não com antioxidantes ou inibidor de MMP2-9 e 30 dias depois foi realizado o teste da esquiua. O gráfico de colunas representam mediana e intervalo interquartil do tempo de latência de teste. Os dados foram analisadas por meio de testes de Mann Whitney, com  $p < 0,05$ , o \* representa a diferença grupo sham, sepse, de animais tratados com inibidor de MMP2-9 e animais tratados com ATX.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que a inflamação sistêmica aguda está associada com marcadores de neurodegeneração no cérebro, que os níveis de sinaptofisina no córtex pré-frontal estão associados com o desempenho no teste de esQUIVA inibitória e inversamente correlacionados com o conteúdo de A $\beta$  no grupo sepse. Sugerem ainda que o tratamento precoce na sepse com inibidor de MMP-2, MMP-9 e antioxidantes (NAC e DFX) pode melhorar o déficit cognitivo tardio.

Há evidências crescentes de que a inflamação e neurodegeneração são eventos relacionados. Verificou-se níveis de procalcitonina (PCT) no fluido cerebrospinal significativamente aumentados em pacientes com DA, demência vascular, demência com corpos de Lewy e demência fronto-temporal, de forma semelhante ao observado em situações neuroinflamatórias agudas, tais como na encefalite e meningite (Ernst *et al.*, 2007).

Atualmente, as consequências da encefalopatia séptica na função cerebral a longo prazo são pouco compreendidas. Demonstrou-se em modelo animal de que a disfunção comportamental é independente dos níveis de glicose cerebral, mas dependente do gene da iNOS, sugerindo uma relação com a manutenção da ativação da microglia (Weberpals *et al.*, 2009). Já se relatou que as fases iniciais da sepse são caracterizadas pela maior produção de espécies reativas, ocasionando estresse oxidativo (Barichello *et al.*, 2006) e que o tratamento antioxidante durante esta fase aguda preveniu o desenvolvimento de danos cognitivos tardios em modelo animal de sepse (Barichello *et al.*, 2007).

Recentemente foi demonstrado que o bloqueio da síntese de TNF- $\alpha$  reduz as múltiplas características marcantes da DA, incluindo o aumento de A $\beta$  e com danos na memória de ratos Tg-DA, preservando os níveis de sinaptofisina (Tweedie *et al.*, 2012). Uma vez que o estresse oxidativo e inflamação são eventos relacionados em ambas, doença neurodegenerativa e sepse, é possível que o estresse oxidativo e ativação da microglia colaborem para danos cognitivos a longo prazo observadas em sobreviventes de sepse.

Microglia é a fonte comum do dano pró-inflamatório e oxidativo em DA, como mostrado pelas observações consistentes de “*upregulation*” de resposta inflamatória em regiões do cérebro que apresentam níveis elevados de marcadores de DA, tais como o córtex

frontal e límbico (Cras *et al.*, 1990; Good *et al.*, 1996). Por outro lado, estes marcadores de inflamação ou de estresse oxidativo estão ausentes ou presentes em quantidades mínimas em regiões do cérebro que são tipicamente menos susceptíveis a eventos neurotóxicos relacionados à patologia da DA, tais como o cerebelo (Akiyama *et al.*, 2000). Sugere-se que a inflamação e aumento do estresse oxidativo, tanto antes de um diagnóstico da doença de Alzheimer (ou, pelo menos, no início da DA), devido a super-ativação de determinadas respostas pró-inflamatórias pelos fagócitos mononucleares, reforçando a ideia de que a inflamação cerebral precoce e estresse oxidativo podem estar relacionados com a de marcadores tardios da neurodegeneração (Nunomura *et al.*, 2001; Fagiolo *et al.*, 1993).

Observou-se também que evidências farmacológicas relacionam a deficiência cognitiva a longo prazo associada sepse com doenças neurodegenerativas (Tuon *et al.*, 2008; Comim *et al.*, 2009; Cassol-Jr *et al.*, 2010), portanto, esta evidência está realcionada com o aumento de  $A\beta$ , tau fosforilada e  $\alpha$ -sinucleína no hipocampo e  $\alpha$ -sinucleína em córtex pre-frontal de animais sépticos. Kaul *et al.*, (2001) verificou diferentes os níveis de  $\alpha$ -sinucleína nas regiões cerebrais, sendo elevados os níveis em tronco e cortex pre-frontal enquanto em hipocampo e cerebelo não se observou. Esta variabilidade pode explicar os níveis aumentados de  $\alpha$ -sinucleína no córtex pré-frontal em nosso estudo. Estas modificações são comuns em condições neurodegenerativas ou processos neurotóxicos agudos, indicando uma disfunção bioquímica resistente no SNC.

Observou-se também, correlação inversa entre os níveis de  $A\beta$  e sinaptofisina e sua relação com o desempenho no teste de esQUIVA inibitória. Essas mudanças sugerem uma correlação temporal com a ocorrência de dano cognitivo no teste dependente do circuito hipocampo-pré-frontais (Tuon *et al.*, 2008), sugerindo uma relação entre estes dois fenômenos. Uma vez que  $A\beta$  desempenha um papel central em eventos neurotóxicos celulares relacionados com perturbações neurodegenerativas tais como DA, também investigou-se uma via relacionada com a neurotoxicidade da  $A\beta$  nestes animais.

A super-expressão e ativação de RAGE no SNC têm sido crescentemente implicada na progressão da neurodegeneração observada na DA e outras perturbações neurodegenerativas (Yan *et al.*, 2009). Acredita-se que a neurotoxicidade relacionada com a sinalização RAGE no cérebro é relacionada tanto com mecanismos que aumentam a expressão de RAGE e/ou a produção e secreção de ligantes de RAGE,

tais como o A $\beta$ , S100B e AGEs (Zhang *et al.*, 2009). Um dos principais alvos intracelulares da ativação RAGE é o factor de transcrição NF-kB, que induz a expressão de colónias de macrófagos, fator estimulante que ativa a microglia, perpetuando a resposta inflamatória e do estresse oxidativo no cérebro (Du Yan *et al.*, 1997). Uma vez que o gene RAGE também contém um elemento de resposta para o NF-kB (p65), a ligação de A $\beta$  com RAGE resulta em um ciclo de *feedback* positivo de indução RAGE, que por sua vez aumenta ainda mais a inflamação do cérebro, o estresse oxidativo e produção de A $\beta$  (Creagh-Brown *et al.*, 2010). Recentemente foi demonstrado que o polimorfismo G82S do RAGE (associada com um aumento da afinidade de ligantes de RAGE) está associada com início precoce da DA e aumento significativo na imunorreatividade de RAGE foi observado no início da DA (Li *et al.*, 2010a).

Além do crescente aumento de dados que apontam para este receptor como um dos principais mediadores da sinalização neurotóxica no cérebro, foi também demonstrado um importante papel para RAGE na progressão da neurodegeneração, a proteína foi identificada como mediadora do transporte de A $\beta$  através da barreira hematoencefálica, assim sendo a principal causa de translocação de A $\beta$  sistêmica para o SNC (Candela *et al.*, 2010). Neste contexto, os nossos resultados sugerem que o cérebro de sobreviventes a sepse são caracterizados por um aumento persistente de vários potenciais mediadores da neurodegeneração da via RAGE, mas, apesar disso, não é possível observar uma relação direta dos níveis de RAGE com o desempenho no teste de esQUIVA inibitória.

Algumas observações e limitações devem ser abordadas. Primeiro, apesar do fato de a esQUIVA inibitória ser uma tarefa dependente do hipocampo não foi possível determinar uma diminuição nos níveis de sinaptofisina no hipocampo ou uma relação do aumentos níveis de A $\beta$  e RAGE no hipocampo com desempenho no teste de esQUIVA inibitória. Isto pode estar relacionado a perda importante de neurônios colinérgicos pré-frontais, como demonstrado por Semmler *et al.*, (2007), e a dependência parcial das conexões neurais pré-frontais no teste de esQUIVA inibitória. Ainda, a dependência pré-frontal da esQUIVA inibitória está relacionada principalmente com a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Garrido *et al.*, 2012), em que já se demonstrou relação entre o dano a memória e alterações no eixo HPA em ratos sobreviventes a sepse (Cassol-Jr *et al.*, 2010). Em segundo lugar, não foi possível determinar se a diminuição dos níveis de

sinaptofisina pré-frontal está realmente relacionada com A $\beta$ , pois não houve aumento significativo dos níveis de A $\beta$  nesta estrutura (apesar do apresentar uma tendência para aumento dos níveis).

O estudo demonstrou que o tratamento com antioxidantes precoce, pode diminuir o deficit cognitivo a longo prazo em modelo animal. A relação entre os níveis de A $\beta$  e sinaptofisina e deficit cognitivo observado em sobreviventes de sepse deve porem, ser interpretados com cautela (Baruch- Suchodolsky, Ficher, 2009; Soscia *et al.*, 2010). Existem algumas evidências que sugerem A $\beta$  poderia ter atividade antioxidante, anti-inflamatória e também anti-microbiana (Rao *et al.*, 2012).

Assim, o aumento dos níveis de A $\beta$  poderia ser um marcador de inflamação, e não um grande componente de deficit cognitivo associada à sepse. Neste contexto, os efeitos dos antioxidantes e inibidores de metaloproteinase na inflamação também podem diminuir indiretamente A $\beta$ . Os marcadores sinápticos como sinaptofisina reduzem a Inflamação quando o estímulo inflamatório não está presente por muito tempo (Rao *et al.*, 2012).

No córtex pré-frontal, foi observado queda nos níveis de sinaptofisina e com pequeno aumento nos seus níveis de tratamentos melhorou o desempenho da memória. Como os níveis de sinaptofisina não aumentaram no grupo controle, é possível pressupor que os antioxidantes ou os inibidores de MMP-2 e MMP-9 melhoram alguns mecanismos associados ao deficit de memória dos ratos sobreviventes a sepse.

Halliwell e Gutteridge (2007) mencionam que os antioxidantes podem interferir com o NO e seus metabólicos ou com espécies reativas de oxigênio que podem ter ligação com a disfunção da mitocôndria. NAC pode atuar como scavenger (limpador) direto no NO e peroxinitrito. NAC e DFX, pode interferir na geração de EROs diminuindo assim o estresse oxidativo e preservando a função mitocondrial. Assim pressupõem-se que NAC associado ao DFX possam ter papel terapêutico para o dano cognitivo tardio em sobreviventes de sepse induzida por modelo CLP (Barrichello *et al.*; 2007).

Conclui-se que foi possível demonstrar que o cérebro dos animais sobreviventes a sepse apresentou vários marcadores de neurodegeneração e o desempenho no teste de esQUIVA inibitória parece ser dependente dos níveis de alguns destes marcadores, sugerindo que um “fenômeno neurodegenerativo” podendo este ser um fator

importante na associação com dano cognitivo a longo prazo em ratos sobreviventes a sepse. Mais estudos podem esclarecer a relação entre dano cognitivo persistente e expressão de RAGE, ativação e produção sistêmica e cerebral de ligantes de RAGE em sobrevivente a sepse.

## Referencias

Agarwal R, Shukla, G.S. Potential role of cerebral glutathione in the maintenance of blood brain barrier integrity in rat. *Neurochem Res.* 1999;14(12):1507-14.

Akiyama H<sup>1</sup>, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2000;21(3):383-421.

Andriantsitohaina R, Duluc L, García-Rodríguez JC, Gil-del Valle L, Guevara-Garcia M, Simard G, Soleti R, Su DF, Velásquez-Pérez L, Wilson JX, Laher I. Systems biology of antioxidants. *Clin Sci.* 2012; 123(3): 173-92.

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(7):1303-10.

Atis S, Nayci A, Ozge A, Comelekoglu U, Gunes S, Bagdatoglu O. N-acetylcysteine protects the rats against phrenic nerve dysfunction in sepsis. *Shock.* 2006;25(1):30-5.

Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today.* 2000;21(9):418-420.

Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Oxidative variables in the rat brain after sepsis

induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* 2006;34(3):886-89.

Barichello T, Machado RA, Constantino L, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho F, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit Care Med.* 2007;35(9):2186-489.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Long-term cognitive impairment in sepsis survivors. *Crit Care Med.* 2005;33(7):1671-72.

Baruch-Suchodolsky R, Fischer B. Aβ<sub>40</sub>, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems. *Biochemistry.* 2009;48(20):4354-70.

Bate C, Gentleman S, Williams A. α-synuclein induced synapse damage is enhanced by amyloid-β<sub>1-42</sub>. *Mol Neurodegener.* 2010;5: 55.

Benajamm CF. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepsis. *Medicina.* 2001;34:18-26.

Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, Wahl P, Ziegler R, Müller M, Nawroth PP. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation.* 1997;96(7):2262-71

Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol.* 1985;101(4):1371-78.

Blennow K, Zetterberg H, Fagan AM. Fluid biomarkers in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(9): a006221.

Blom ES, Giedraitis V, Zetterberg H, Fukumoto H, Blennow K, Hyman BT, Irizarry MC, Wahlund LO, Ingelsson M. Rapid progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease in subjects with elevated

levels of tau in cerebrospinal fluid and the APOE 14/14 genotype. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009;27:458-64.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RR, Fein AM, Knaus WA and the ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*. 1992;101:1644-55.

Bone RC. Sepsis, SIRS, and CARS. *Critical Care Medicine*. 1996a;24:1125-28.

Bone RC. The sepsis syndrome. Definition and general approach to management. *Clin Chest Med*. 1996b;17(2):175-81.

Bonini NM, Giasson BI. Snaring the function of alpha-synuclein. *Cell*. 2005; 123(3):359-61.

Bozza FA, D'ávila JCP, Cristiane Ritter, Romain Sonnevile , Tarek Sharshar, Felipe Dal-Pizzol 2013. Bioenergetics mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. *Shock* 39: 10-16.

Braak E, Braak H, Mandelkow EM. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol*. 1994;87:554-67.

Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197-211.

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR,

Godowski PJ, Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 1999;285(5428):732-6.

Buckingham SD, Jones AK, Brown LA, Sattelle DB. Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol Rev*. 2009;61:39-61.

Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci*. 2002;22(20):8797-807.

Candela P, Gosselet F, Saint-Pol J, Sevin E, Boucau MC, Boulanger E, Cecchelli R, Fenart L. Apical-to-basolateral transport of amyloid-beta peptides through blood-brain barrier cells is mediated by the receptor for advanced glycation end-products and is restricted by P-glycoprotein. *J Alzheimers Dis*. 2010;22:849-59.

Carrano A, Hoozemans JJ, van der Vies SM, Rozemuller AJ, van Horsen J, de Vries HE. Amyloid beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011;15:1167-78.

Caspersen C, Wang N, Yao J, Sosunov A, Chen X, Lustbader JW, Xu HW, Stern D, McKhann G, Yan SD. Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2005;19(14):2040-1.

Cassol-Jr, OJ, Comim CM, Petronilho F, Constantino LS, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Low dose dexamethasone reverses depressive-like parameters and memory impairment in rats submitted to sepsis. *Neurosci Lett*. 2010;473:126-130.

Choi SH, Aid S, Kim HW, Jackson SH, Bosetti F. Inhibition of NADPH oxidase promotes alternative and anti-inflammatory microglial activation during neuroinflammation. *Journal of Neurochemistry*. 2012;120:292-301.

Christman JW; Lancaster LH; Blackwell TS. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Intensive Care Med*. 1998;24:1131-38.

Chung CY, Koprach JB, Siddiqi H, Isacson O. Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy. *J Neurosci*. 2009;29(11):3365-73.

Clare R, King VG, Wirenfeltd M, Vinters HV. Synapse loss in dementias. *J Neurosci Res*. 2010;88(10):2083-90.

Clayton DF, George JM. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci*. 1998;21(6):249-254.

Comim CM, Pereira JG, Steckert A, Petronilho F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Rivastigmine reverses habituation memory impairment observed in sepsis survivor rats. *Shock*. 2009;32:270-1.

Concha, HA. Papel das metaloproteinases de matriz nas alterações da barreira hematoencefálica em ratos submetidos à sepse severa. orientador: Felipe Dal-Pizzol ; co-orientador: João Quevedo. – Criciúma : Ed. do Autor, 2010. 73 f. : il. ; 30 cm.

Cras P, Kawai M, Siedlak S, Mulvihill P, Gambetti P, Lowery D, Gonzalez-DeWhitt P, Greenberg B, Perry G. Neuronal and microglial involvement in beta-amyloid protein deposition in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1990;137:241-6.

Creagh-Brown BC, Quinlan G J, Evans TW. RAGE inhibition: healthy or harmful? *Crit Care Med.* 2010;38:1487-90.

Cuzzocrea S, Rilley DP, Caouti AP, Salvenini A. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 2001; 53(1):135-59.

Czeh B, Lucassen PJ. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2007;257:250-60.

Daly C, Ziff EB. Ca<sup>2+</sup>-dependent formation of a dynamin-synaptophysin complex: potential role in synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem.* 2002;277(11):9010-5.

Deane R, Singh I, Sagare AP, Bell RD, Ross NT, LaRue B, Love R, Perry S, Paquette N, Deane RJ, Thiagarajan M, Zarcone T, Fritz G, Friedman AE, Miller BL, Zlokovic BV. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid beta-mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation.* 2012;122:1377-92.

Dekosky ST, Abrahamson EE, Ciallella JR, Paljug WR, Wisniewski SR, Clark RS, Ikonovic MD. Association of increased cortical soluble abeta42 levels with diffuse plaques after severe brain injury in humans. *Arch Neurol.* 2007;64:541-4.

Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* 2013;39(2):165-228.

Dix TA, Hess KM, Medina MA, Sullivan RW, Tilly SL, Webb LL. Mechanism of site-selective DNA nicking by the hydrodioxyl (perhydroxyl) radical. *Biochemistry*. 1996;35:4578-83.

Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, et al.: Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med*. 2007;35:1414-15.

Donato R. 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2001;33:637-68.

Du H, Guo L, Zhang W, Rydzewska M, Yan S. Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer disease mouse model. *Neurobiol Aging*. 2011;32(3):398-406.

Durant R, Klouche K, Delbosc S, Morena M, Amigues L, Beraud JJ, Canaud B, Cristol JP. Superoxide anion overproduction in sepsis: effects of vitamin nad simvastatin. *Shock*. 2004;22:34-9.

Eaton JW. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the besitiary. *J Lab Clin Med*. 1991;118:3-4.

Ernst A, Morgenthaler NG, Buerger K, Dodel R, Noelker C, Sommer N, Schwarz M, Koehrlé J, Bergmann A, Hampel H. Procalcitonin is elevated in the cerebrospinal fluid of patients with dementia and acute neuroinflammation. *J Neuroimmunol*. 2007, 189(1-2):169-74.

Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, Monti D, Franceschi C, Paganelli R. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol*. 1993;23:2375-78.

Faix DJ. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Lab Sci.* 2013;508(1):23-36.

Fang F, Lue LF, Yan S, Xu H, Luddy JS, Chen D, Walker DG, Stern DM, Schmidt AM, Chen JX, Yan SS. RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2010;24:1043-55.

Foell D, Roth J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3762-71.

Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J. Leukoc. Biol.* 2007;81:28-37.

Frosch M, Strey A, Vogl T, Wulffraat NM, Kuis W, Sunderkötter C, Harms E, Sorg C, Roth J. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:628-37.

Furukawa-Hibi Y, Nitta A, Fukumitsu H, Somiya H, Furukawa S, Nabeshima T, Yamada K. Overexpression of piccolo C2A domain induces depression-like behavior in mice. *Neuro Report.* 2010;21:1177-81.

Galasko D, Chang L, Motter R, Clark CM, Kaye J, Knopman D, Thomas R, Kholodenko D, Schenk D, Lieberburg I, Miller B, Green R, Basherad R, Kertiles L, Boss MA, Seubert P. High cerebrospinal fluid tau and low amyloid b42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol.* 1998;55:937-45.

Galvin JE, Uryu K, Lee VM, Trojanowski JQ. Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains alpha-

beta-, and gamma-synuclein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(23):13450-5.

Garden GA, Möller T. Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006;1:127-37.

Garrido P, De Blas M, Giné E, Santos Á, Mora F. Aging impairs the control of prefrontal cortex on the release of corticosterone in response to stress and on memory consolidation. *Neurobiol Aging*. 2012;33:827e1-9.

Gonzalez-Burgos G, Fish KN, Lewis DA. GABA neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia. *Neural Plast*. 2011;2011:723184.

Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1996;149:21-8.

Gunther ML, Morandi A, Krauskopf E, Pandharipande P, Girard TD, Jackson JC, Thompson J, Shintani AK, Geevarghese S, Miller RR 3rd, Canonico A, Merkle K, Cannistraci CJ, Rogers BP, Gatenby JC, Heckers S, Gore JC, Hopkins RO, Ely EW; VISIONS Investigation, VISualizing Icu SurvivOrs Neuroradiological Sequelae. The association between brain volumes, delirium duration, and cognitive outcomes in intensive care unit survivors: the VISIONS cohort magnetic resonance imaging study\*. *Crit Care Med*. 2012;40(7):2022-32.

Haapasalo A, Viswanathan J, Bertram L, Soininen H, Tanzi RE, Hiltunen M. Emerging role of Alzheimer's disease-associated ubiquilin-1 in protein aggregation. *Biochem Soc Trans*. 2010;38:150-5.

Halliwell B, Gutteridge J. *Freen RADICALS IN Biology and Medicine*. Oxford University Press. Fourth Edition, 2007.

Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: A follow-up study. *Lancet Neurol*. 2006;5:228-34.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297:353-6.

Heeg K, Dalpke A. TLR-induced negative regulatory circuits: Role of suppressor of cytokine signaling (SOCs) proteins in innate immunity. *Vaccine*. 2003;2:61-67.

Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front. Biosci*. 2002;7:d1356-68.

Hesse C, Rosengren L, Andreasen N, Davidsson P, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Blennow K. Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neurosci Lett*. 2007; 297:187-90.

Hopkins RO, Weaver LK, Pope D, Orme JF, Bigler ED, Larson - Iohr V. Neuropsychological sequelae and impairment health status in survivors of severe acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;161:50-6.

Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348(2):138-50.

Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(3):260-8.

Jacobone E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens RD, Sharshar T. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Crit Care Med.* 2009;37(10):331-6.

Ikonomovic MD, Uryu K., Abrahamson EE, Ciallella JR, Trojanowski JQ, Lee VM, Clark RS, Marion DW, Wisniewski SR, DeKosky ST. Alzheimer's pathology in human temporal cortex surgically excised after severe brain injury. *Exp Neurol* 2004;190:192-203.

Ishibashi K, Tomiyama T, Nishitsuji K, Hara M, Mori H. Absence of synaptophysin near cortical neurons containing oligomer Abeta in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci Res.* 2006;84(3):632-6.

Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA.* 2010;304(16):1787-94.

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature.* 1998;393:635-6.

JOHNSON, V.E.; STEWART, W.; SMITH, D.H. Traumatic brain injury and Amyloid amyloid-beta pathology: a link to Alzheimer's disease? *Nat Rev Neurosci*, v. 11, p. 361-370, 2010.

Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1589(1):1-13.

Kang J, Park EJ, Jou I, Kim JH, Joe EH. Reactive oxygen species mediate A beta(25-35)-induced activation of BV-2 microglia. *Neuroreport.* 2001;12:1449-52.

Kaul T, Credle J, Haggerty T, Oaks AW, Masliah E, Sidhu A. Region-specific tauopathy and synucleinopathy in brain of the alpha-synuclein

overexpressing mouse model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci.* 2011;3:12-79.

Kazantsev AG, Kolchinsky AM. Central role of alpha-synuclein oligomers in neurodegeneration in Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2008;65(12):1577-81.

Konarska M, Stewart RE, McCarty R. Predictability of chronic intermittent stress: effects on sympathetic-adrenal medullary responses of laboratory rats. *Behav Neural Biol.* 1990;53(2):231-43.

Kramer ML, Schulz-Schaeffer WJ. Presynaptic  $\alpha$ -Synuclein Aggregates, Not Lewy Bodies, Cause Neurodegeneration in Dementia with Lewy Bodies. *J Neurosci.* 2007;27(6):1405-10.

Kung HC, Hoyert DL, Xu J; Murphy SL. Deaths: final data for 2005. *National Vital Statistic Report.* 2008;56 (10):1-120.

Lee VMY, Trojanowski JQ. Mechanisms of Parkinson's Disease Linked to Pathological [alpha]-Synuclein: New Targets for Drug Discovery. *Neuron.* 2006;52(1):33-8.

Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, Yang R, Ochani M, Qiang X, Harris HE, Czura CJ, Wang H, Ulloa L, Wang H, Warren HS, Moldawer LL, Fink MP, Andersson U, Tracey KJ, Yang H. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol Med.* 2003;9(1-2):37-45.

Li J, Li XY, Feng DF, Pan DC. Biomarkers associated with diffuse traumatic axonal injury: exploring pathogenesis, early diagnosis, and prognosis. *J Trauma.* 2010;69:1610-8.

Li K, Dai D, Zhao B, Yao L, Yao S, Wang B, Yang Z. Association between the RAGE G82S polymorphism and Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2010;117(1):97-104.

Lou H. Etiology and pathogenesis of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): significance of prematurity and perinatal hypoxic-haemodynamic encephalopathy. *Acta Paediatr.* 1996;85(11):1266-71.

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1999;155(3):853-62.

Lue LF, Walker DG, Rogers J. Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures. *Neurobiology of aging.* 2001;22:945-56.

Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1182-90.

Macarthur H, Westffal TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc Natl Acad Science;* 2000;97:9753-8.

Maddalena A, Papassotiropoulos A, Muller-Tillmanns B, Jung HH, Hegi T, Nitsch RM, Hock C. 2003. Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to bamyloid peptide42. *Arch Neurol.* 2003;60:1202-6.

Marshall JC; Dellinger RP; Levy M. The Surviving Sepsis Campaign: A History and a Perspective. *Surg Infect.* 2010;11:275-81.

Martin-Moreno AM, Reigada D, Ramirez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, de Ceballos ML. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Molecular Pharmacology*. 2011;79:964-97.

Matejovic M, Krouzecky A, Martinkova V, Rokyta R Jr, Radej J, Kralova H, Treska V, Radermacher P, Novak I. Effects of tempol, a free radical scavenger, on long-term hyperdynamic porcine bacteremia. *Crit Care Med*. 2005;33:1057-1063.

Mello Filho AC, Hoffmann ME, Meneghini R. Cell Killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Jornal Biochemistry* 1993 218:273-275.

Messarís E, Antonakis PT, Memos N, Chatzigianni E, Leandros E, Konstadoulakis MM. Deferozamine administration in septic animals: improved survival and altered apoptotic gene expression. *Int Immunopharmacol*. 2004;4:455-9.

Miranda, RCCC. Encefalopatia Associada a Sepsis: disfunção comportamental metabólica e mitocondrial em modelo de sepsis abdominal. Rio de Janeiro, 2010. Xxi,66f,Il.30cm.

Neumeister A, Wood S, Bonne O, Nugent AC, Luckenbaugh DA, Young T, Bain EE, Charney DS, Drevets WC. Reduced hippocampal volume in unmedicated, remitted patients with major depression versus control subjects. *Biol. Psychiatry*. 2005;57:935-7.

Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60(8):759-67.

Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling — regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med* 2000;28:Suppl:N3-N12.

Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg.* 1991;214(5):621-6.

Ost M, Nylén K, Csajbok L, Ohrfelt AO, Tullberg M, Wikkelso C, Nellgård P, Rosengren L, Blennow K, Nellgård B. 2006. Initial CSF total tau correlates with 1-year outcome in patients with traumatic brain injury. *Neurology.* 2006;67:1600-4.

Perry VH. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun.* 2004;18:407-13.

Portella, Viviane Gomes. Desenvolvimento da insuficiência renal promovida pela sepse induzida pelo modelo CLP (Cecal Ligation and Puncture): avaliação morfológica e de parâmetros renais. [manuscrito] / Viviane Gomes Portella. – 2010. 75 f. : il. ; 29,5 cm.

Pruitt JH, Welborn MB, Edwards PD, Harward TR, Seeger JW, Martin TD, Smith C, Kenney JA, Wesdorp RI, Meijer S, Cuesta MA, Abouhanze A, Copeland EM 3rd, Giri J, Sims JE, Moldawer LL, Oldenburg HS. Increased soluble interleukin-1 type II receptor concentrations in postoperative patients and in patients with sepsis syndrome. *Blood* 1996;87:3282-8.

Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, de-Paris F, Izquierdo I, Rose SP. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem.* 1999;6(6):600-7.

Rao JS, Kellom M, Kim HW, Rapoport SI, Reese EA. Neuroinflammation

and synaptic loss. *Neurochem Res* v. 2012,37(5):903-10.

Riemenschneider M, Lautenschlager N, Wagenpfeil S, Diehl J, Drzezga A, Kurz A. Cerebrospinal fluid tau and b-amyloid 42 proteins identify Alzheimer disease in subjects with mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2002;59:1729-34.

Ritter C, Andrades M, Frota Júnior ML, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, Klamt F, Pinheiro CT, Menna-Barreto SS, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med*. 2003;29(10):1782-9.

Sales Junior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS, Friedman G, da Silva OB, Dias MD, Koterba E, Dias FS, Piras C, Grupo de Estudo de Sepse do Fundo AMIB, Luiz RR. Sepse Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. *Rev. bras. ter. intensiva* [online]. 2006, vol.18, n.1 [cited 2013-08-22], pp. 9-17.

Samgard K, Zetterberg H, Blennow K, Hansson O, Minthon L, Londos E. Cerebrospinal fluid total tau as a marker of Alzheimer's disease intensity. *Int J Geriatr Psychiat*. 2009;25:403-10.

Scaini G, Rochi N, Benedet J, Ferreira GK, Teodorak BP, Comim CM, Constantino LS, Vuolo F, Constantino LC, Quevedo J, Streck EL, Dal-Pizzol F. Inibição da atividade da citrato sintase cerebral em um modelo animal de sepse. *Rev. bras. ter. intensiva*, São Paulo, v. 23, n. 2, June 2011.

Schmidt AM, Stern DM. Hyperinsulinemia and vascular dysfunction: the role of nuclear factor-kappaB, yet again. *Circulation Research*. 2000;87:722-4.

Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, Heneka MT. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol*. 2007;204(2):733-40.

Semmler A, Hermann S, Mormann F, Weberpals M, Paxian S, Okull T, Schäfers M, Kummer M, Klockgether T, Heneka M. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *J Neuroinflammation*. 2008;5:38-47.

Semmler A, Widmann CN, Okulla T, Urbach H, Kaiser M, Widman G, Mormann F, Weide J, Fliessbach K, Hoeft A, Jessen F, Putensen C, Heneka MT. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(1):62-9.

Sikora JP, Chlebna-Sokol D, Krzyzanskna-Oberbek A. Proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8); cytokines inhibitors (IL-6sR, sTNFRII) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-13) in the pathogenesis of sepsis in newborn and infants. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2001;49:399-404.

Silva E, Pedro MA, Sogayar ACB, Mohovic T, Silva CLO, Janiszewski M, Cal RGR, Sousa EF, Abe TP, Andrade J, Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PCS, Matos GFJ, Bento AM, Correa AD, Vieira PCB, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES Study). *Crit Care Med*. 2004;8:251-60.

Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:367-88.

Singer M. Cellular dysfunction in sepsis. *Clin Chest Med*. 2008 Dec;29(4):655-60, viii-ix. doi: 10.1016/j.ccm.2008.06.003.

Smith DH, Chen XH, Iwata A, Graham DI. Amyloid beta accumulation in axons after traumatic brain injury in humans. *J Neurosurg*. 2003;98:1072-77.

Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One*. 2010;5(3):e9505.

Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen AM, Aarsman CJ, van Oirschot JF, van der Bruggen T, van Asbeck BS. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1283-93.

Sun J. Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases are essential for the inflammatory response in cancer cells. *J Signal Transduct* 2010 (In Press).

Swiergiel AH, Dunn AJ. Distinct roles for cyclooxygenases 1 and 2 in interleukin-1-induced behavioral changes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302:1031-36.

Takuma K, Fang F, Zhang W, Yan S, Fukuzaki E, Du H, Sosunov A, McKhann G, Funatsu Y, Nakamichi N, Nagai T, Mizoguchi H, Ibi D, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Yamada K, Yan SS. RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-beta and neuronal dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:20021-6.

Tan JM, Wong ES, Lim KL. Protein misfolding and aggregation in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(9):2119-34.

Teeling JL, Perry VH. Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms. *Neuroscience*. 2009;158:1062-73.

Tillement JP, Lecanu L, Papadopoulos V. Amyloidosis and neurodegenerative diseases: current treatments and new pharmacological options. *Pharmacology*. 2010;85(1):1-17.

Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Memory-enhancing treatments reverse the impairment of inhibitory avoidance retention in sepsis-surviving rats. *Crit Care*. 2008;12(5):R133.

Turrin NP, Rivest S. Unraveling the molecular details involved in the intimate link between the immune and neuroendocrine systems. *Exp Biol Med*. 2004;229:996-1006.

Tweedie D, Ferguson RA, Fishman K, Frankola KA, Van Praag H, Holloway HW, Luo W, Li Y, Caracciolo L, Russo I, Barlati S, Ray B, Lahiri DK, Bosetti F, Greig NH, Rosi S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  synthesis inhibitor 3,6'-dithiothalidomide attenuates markers of inflammation, Alzheimer pathology and behavioral deficits in animal models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2012;9:106.

Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. Review Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays*. 2004;26(4):445-53.

Van Der, Poll; Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 8: 32-43. 2008.

Van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frolich M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet*. 1998; 351:950-53.

van Eldik LJ, Thompson WL, Ralay Ranaivo H, Behanna HA, Martin Watterson D. Review Glia proinflammatory cytokine upregulation as a therapeutic target for neurodegenerative diseases: function-based and target-based discovery approaches. *Int Rev Neurobiol*. 2007;82:277-96.

van Gool WA, van de Beek D, Eikelenboom P. Systemic infection and delirium: when cytokines and acetylcholine collide. *Lancet*. 2010 Feb 27;375(9716):773-5.

Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(6):1781-5.

Waage A, Halstensen A, Shalaby R, Brandtzæg P, Kierulf P, Espevik T. Local production of tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1 and interleukin 6 in meningococcal meningitis: relation to the inflammatory response. *J Exp Med.* 1989;170:1859-67.

Waites CL, Garner CC. Presynaptic function in health and disease. *Trends Neurosci.* 2011;34:326-33.

Wallin AK, Hansson O, Blennow K, Londos E, Minthon L. Can CSF biomarkers or pre-treatment progression rate predict response to cholinesterase inhibitor treatment in Alzheimer's disease? *Int J Geriatr Psychiat.* 2009;24:638-47.

Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* 1999, 285(5425):248-51.

Wang TS, DENG JC. Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression. *J MolMed.* 2008,86(5): 495-506.

Weberpals M, Hermes M, Hermann S, Kummer MP, Terwel D, Semmler A, Berger M, Schäfers M, Heneka MT. NOS2 gene deficiency protects from sepsis-induced long-term cognitive deficits. *J Neurosci.* 2009,29(45):14177-84.

Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980,29(2):189-201.

Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med*. 2010,38(5):1276-83.

Wuwongse S, Cheng SS, Wong, GT, Hung, CH, Zhang NQ, Ho, YS. Effects of corticosterone and amyloid-beta on proteins essential for synaptic function: Implications for depression and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013,1832(12):2245-56.

Xiang L, Klintman D, Thorlacius H. Allopurinol inhibits CXC chemokine expression and leukocyte adhesion in endotoxemic liver injury. *Inflamm Res*. 2003,52(9):353-8.

YAN SD, BIERHAUS A, NAWROTH PP, STERN DM. RAGE and Alzheimer's disease: a progression factor for amyloid-beta-induced cellular perturbation? *J Alzheimers Dis*. 2009,16(4):833-43.

Yang D, Li Q, Fang L, Cheng K, Zhang R, Zheng P, Zhan Q, Qi Z, Zhong S, Xie P. Reduced neurogenesis and pre-synaptic dysfunction in the olfactory bulb of a rat model of depression. *Neuroscience*. 2011,192:609-18.

Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes*. 2000;50:1495-504.

Zetterberg H, Wahlund LO, Blennow K. Cerebrospinal fluid markers for prediction of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2003;352(1):67-9.

Zetterberg H, Hietala MA, Jonsson M, Andreasen N, Styrd E, Karlsson I, Edman A, Popa C, Rasulzada A, Wahlund LO, Mehta PD, Rosengren

L, Blennow K, Wallin A. Neurochemical aftermath of amateur boxing. Arch Neurol. 2006;63(9):1277-80.

Zhang H, Adwanikar H, Werb Z, Noble-Haeusslein, L.J. Matrix metalloproteinases and neurotrauma: evolving roles in injury and reparative processes. Neuroscientist. 2010;16(2):156-70.

Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. Intensive Care Med. 2000;26(4):474-76.

Zhang J<sup>1</sup>, Zhen YF, Pu-Bu-Ci-Ren, Song LG, Kong WN, Shao TM, Li X, Chai XQ. Salidroside attenuates beta amyloid-induced cognitive deficits via modulating oxidative stress and inflammatory mediators in rat hippocampus. Behavioural Brain Research. 2013;244:70-81.

Zhang L, Postina R, Wang Y. Ectodomain shedding of the receptor for advanced glycation end products: a novel therapeutic target for Alzheimer's disease. Cell Mol Life Sci. 2009;66(24):3923-35.

Zong H, Madden A, Ward M, Mooney MH, Elliott CT, Stitt AW. Homodimerization is essential for the receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated signal transduction. Journal of Biological Chemistry. 2010;285(30):23137-46.