

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

RODRIGO FRAGA OLIVIERI

**O PAPEL DA SEPSE E DA IDADE COMO INSULTOS INFLAMATÓRIOS NA
PROGRESSÃO DO DECLÍNIO COGNITIVO E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA
NEURODEGENERAÇÃO**

CRICIÚMA

2019

RODRIGO FRAGA OLIVIERI

**O PAPEL DA SEPSE E DA IDADE COMO INSULTOS INFLAMATÓRIOS NA
PROGRESSÃO DO DECLÍNIO COGNITIVO E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA
NEURODEGENERAÇÃO**

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

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol.

CRICIÚMA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

O49p Olivieri, Rodrigo Fraga.
O papel da sepse e da idade como insultos
inflamatórios na progressão do declínio cognitivo
e sua contribuição para neurodegeneração /
Rodrigo Fraga Olivieri. - 2019.
71 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.
Orientação: Felipe Dal Pizzol.

1. Sepse. 2. Ligadura e perfuração cecal. 3.
Inflamação 4. Disfunção cognitiva. 5. Memória. I.
Título.

CDD 23. ed. 616.944

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



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Rogério da Silva Resende**, sob o título **“PREVALÊNCIA DE HIPERTENSÃO E ASSOCIAÇÃO COM SAÚDE MENTAL EM IDOSOS LONGEVOS E INSTITUCIONALIZADOS”**, 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 o candidato, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Tese.

Criciúma, SC, 30 de agosto de 2019.

Prof. Dra. CINARA LÚDVIK GONÇAVES
Membro Relator – UNESC

Prof. Dra. GISLAINE ZILLI RÉUS
Membro Interno – UNESC

Prof. Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO
Membro Externo – UNISUL

Prof. Dra. TALITA TUON
Membro Externo – UFSC

Prof. Dra. Josiane Budni
Orientadora

Prof. Dr. Felipe dal Pizzol
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

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

“Não devemos ter medo das novas ideias!

Elas podem significar a diferença entre o triunfo e o fracasso”.

Napoleon Hill

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Felipe Dal Pizzol, que mesmo com a distância permaneceu acessível durante todo o tempo, permitindo me fazer acreditar e não desistir do meu objetivo.

Ao Laboratório de Fisiopatologia que tão bem me acolheu, permitindo-me crescimento profissional e pessoal.

A Monique Michels, pela sua dedicação e apoio incondicional, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Aos colegas de doutorado, pelas novas amizades realizadas e pelo apoio nos momentos de dificuldade.

À minha família, que sempre me apoiou, com palavras e orações, fazendo-me acreditar que tudo daria certo, pois é na educação dos filhos que se revela a virtude dos pais.

E, em especial, a minha esposa Juliana, que sempre me incentivou, com palavras e com atenção em todos os momentos, nos mais fáceis e nos mais difíceis. Sempre que precisei de ajuda ela estava lá para me dar atenção e carinho.

A todos, meu muito obrigado!

RESUMO

A sepse, atualmente, é definida como uma disfunção orgânica com alto risco de morte, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro ao insulto infeccioso que pode ser significativamente amplificado por fatores endógenos. Apesar dos avanços significativos em seu tratamento, a sepse continua sendo uma das principais causas de mortalidade e morbidade. Estudos recentes sugerem que uma comunicação bidirecional entre o cérebro e o sistema imunológico é crucial para manter a homeostase do sistema nervoso central (SNC). As taxas de mortalidade e morbidade em doenças infecciosas são mais altas em idosos quando comparadas a adultos, e a inflamação sistêmica está emergindo como um fator significativo de declínio cognitivo no cérebro idoso e vulnerável. Este estudo teve como objetivo avaliar o papel da Sepse, induzida por CLP, e da idade como insultos inflamatórios na progressão do declínio cognitivo e sua contribuição para a neurodegeneração em ratos Wistar machos jovens (2 meses) observados 60 e 90 dias após a cirurgia (etapa 1 e 2, respectivamente); e animais jovens (2 meses) e adultos (6 meses) submetidos à sepse e observados 30 dias após a cirurgia (etapa 3). Animais com 2 meses de idade observados 60 e 90 dias após a cirurgia foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos e o córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (HIPO) foram removidos para a determinação dos níveis de citocinas fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6), atividade da mieloperoxidase (MPO), a determinação dos níveis de peptídeo beta-amilóide (β A) por meio do Western Blot, e imuno-histoquímica para os marcadores de ativação microglial (molécula adaptadora ionizada de ligação ao cálcio 1 (IBA-1), Óxido nítrico sintase induzível (iNOS), marcador de macrófago b (CD11b); arginase (Arg) e interleucina 10 (IL-10). Os animais com 2 e 6 meses, após 30 dias da CLP, foram submetidos aos testes comportamentais do nado forçado e esquiva inibitória, e o CPF e HIPO foram removidos para a determinação dos níveis de β A por Western Blot, de dano oxidativo (TBARs e proteína carbonilada) e níveis de citocina (IL-1 β e IL-6). Em ratos com 2 e 6 meses, 30 dias após CLP, a sepse causou dano no desempenho da tarefa de esquiva inibitória e aumentou o tempo de imobilidade no teste de nado forçado. Tanto a sepse quanto a idade induziram inflamação cerebral e o aumentando dos níveis de TBARs em CPF na idade de 6 meses e, no HIPO, em ambas as idades. Os níveis de β A também estavam aumentados na idade de 6 meses, 30 dias após CLP no CPF e no HIPO. A sepse, juntamente com o avanço da idade, teve efeitos aditivos nos níveis de IL-1 β no hipocampo e nos níveis de carbonila no córtex pré-frontal nesses animais. No hipocampo, dos animais observados 60 e 90 dias após CLP, houve aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 β . Isso também ocorreu com os níveis de IL-1 β e IL-6 no córtex pré-frontal. Isto foi associado com aumento persistente na ativação da micróglia e nos níveis de β A. Os resultados apontam, portanto, que um dano cerebral pode influenciar o processo de envelhecimento induzindo alterações no SNC, principalmente por induzir neuroinflamação, em animais sépticos.

Palavras-chaves: sepse, CLP, inflamação, cognição, memória

ABSTRACT

Sepsis is currently defined as a high-risk-of-death organ dysfunction caused by an unregulated host response to infectious insult that can be significantly amplified by endogenous factors. Despite significant advances in its treatment, sepsis remains a major cause of mortality and morbidity. Recent studies suggest that bi-directional communication between the brain and the immune system is crucial to maintaining central nervous system (CNS) homeostasis. Mortality and morbidity rates in infectious diseases are higher in the elderly compared to adults, and systemic inflammation is emerging as a significant factor in cognitive decline in the elderly and vulnerable brain. This study aimed to evaluate behavioral, neurochemical and neuroinflammatory parameters induced by PLC sepsis in the progression of the physiological process of brain aging in young (2 months) and adult (6 months) male Wistar rats submitted to sepsis and observed 30 days after sepsis. surgery; and in rats with young (2 months) observed 60 and 90 days after surgery. 2-month-old animals observed 60 and 90 days after surgery underwent an object recognition test and the prefrontal cortex and hippocampus were removed for cytokine, myeloperoxidase (MPO), beta-amyloid peptide ($A\beta$) and immunohistochemistry for microglial activation markers. In animals aged 2 and 6 months, after 30 days of CLP, they were subjected to forced swim behavioral and inhibitory avoidance tests, β -amyloid content, oxidative damage and cytokine levels were measured in the hippocampus and prefrontal cortex. In rats at 2 and 6 months, 30 days after CLP, sepsis impaired the performance of the inhibitory avoidance task and increased immobility time in the forced swim test. Both sepsis and aging induced brain inflammation and oxidative damage and increased $A\beta$ content. Sepsis, along with aging, had additive effects on interleukin-1 levels in the hippocampus and carbonyl levels in the prefrontal cortex in these animals. In the hippocampus, the animals observed 60 and 90 days after CLP increased TNF- α and IL-1 β levels in septic animals. This also occurred with IL-1 β and IL-6 levels in the prefrontal cortex. This was associated with a persistent increase in microglia activation and $A\beta$ levels. The results indicate, therefore, that brain damage can influence the aging process by inducing glial and neuronal changes, mainly by inducing neuroinflammation, impacting the mental health of the elderly, which ultimately contributes to its lower quality of life.

Keywords: sepsis, CLP, inflammation, cognition, memory

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diagnostico pelo SOFA	18
Figura 2. Doença de Alzheimer e peptídeo β A.	21
Figura 3. Desenho experimental. Etapa 1: animais com idade de 2 meses observados 60 dias após procedimento cirúrgico.	32
Figura 4. Desenho experimental. Etapa 2: animais com idade de 2 meses observados 90 dias após procedimento cirúrgico.	32
Figura 5. Desenho experimental. Etapa 3: animais com idade de 2 e 6 meses observados 30 dias após procedimento cirúrgico.	33
Figura 6. Efeito do CLP na memória de reconhecimento de novos objetos.	39
Figura 7. Efeito da idade no comprometimento cognitivo a longo prazo após sepse	40
Figura 8. Parâmetros inflamatórios no hipocampo e no córtex pré-frontal 60 e 90 dias após a indução da sepse	42
Figura 9. Efeitos da idade na inflamação cerebral após a indução da sepse	43
Figura 10. IBA-1 (A - 60 dias e B - 90 dias), CD11-b (C - 60 dias e D - 90 dias), iNOS (E - 60 dias e F - 90 dias); Arginase (G - 60 dias e H - 90 dias) e IL - 10 (I - 60 dias e J - 90 dias), por imunohistoquímica em hipocampo de animais submetidos a sepse.....	45
Figura 11. Níveis de β A no hipocampo e no córtex pré-frontal após a indução da sepse.....	46
Figura 12. Neuroinflamação pela expressão de β -amilóide no hipocampo e no córtex pré-frontal de animais com 2 e 6 meses de idade submetidos a sepse.	47
Figura 13. Efeitos da idade no estresse oxidativo após a indução da sepse. A sepse foi induzida por ligadura e perfuração cecal em animais com 2 e 6 meses de idade.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância (do inglês: *analysis of variance*)

ATP - Trifosfato de adenosina

Arg - Arginase

BASES - Brazilian Sepsis Epidemiological Study

CAT – Catalase

CD11b - marcador de macrófago b (do inglês: *marker of macrophage-b*)

CLP - Ligadura e perfuração cecal

CPF – Córtex pré-frontal

DA - Doença de Alzheimer

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ELISA - Imunoensaio enzimático (do inglês: *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*)

ERNs - Espécies reativas ao nitrogênio

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GFAP - Proteína ácida fibrilar glial (do inglês: *Glial fibrillary acidic protein*)

GPx - Glutaciona peroxidase

HIPO - Hipocampo

IBA-1 - Molécula adaptadora ionizada de ligação ao cálcio 1 (do inglês: *ionized calcium-binding adapter molecule 1*)

IL-1 - Interleucina 1

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível (do inglês: *inducible nitric oxide synthase*)

ISA – Inflamação sistêmica aguda

LPA - Lesão pulmonar aguda

LTP - Potencial de longa duração

MDA - Malondialdeído

NF- κ B - Factor nuclear kappa B (do ingles: *nuclear factor kappa B*)

PolyIC - ácido polinossínico-policitidílico (do inglês: *polyinosinic-polycytidylic acid*)

RAGE - Receptor para produtos finais de glicação avançada (do inglês: *receptor for advanced glycation end products*)

SIRS - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (do inglês: *systemic inflammatory response syndrome*)

SNC - Sistema nervoso central

SOD - Superóxido dismutase

SOFA - Sequencial de Avaliação de Falha de Órgão (do inglês: *Sequential Organ Failure Assessment*)

TLR - Receptor Toll-like -4

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α (do inglês: *Tumor necrosis factor alpha*)

β A – Peptídeo beta amiloide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 SEPSE.....	16
1.2 A SEPSE E ALTERAÇÕES COGNITIVAS EM SOBREVIVENTES	19
1.3 O AVANÇO DA IDADE E AS ALTERAÇÕES DO SNC.....	22
1.4 JUSTIFICATIVA	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 ANIMAIS	30
3.1.1 Ética	30
3.1.4 Indução de Sepsis - Modelo de ligadura e perfuração Cecal (CLP)	30
3.1.3 Projeto Experimental	30
3.1.4 Reconhecimento de novos objetos	33
3.1.5 Teste do nado forçado	34
3.1.6 Esquiva inibitória	34
3.1.7 Eutanásia	34
3.2 TESTES BIOQUÍMICOS	35
3.2.1 Níveis De Citocinas	35
3.2.2 Atividade De Mieloperoxidase (MPO).....	35
3.2.3 Imuno-Histoquímica IBA-1, iNOS, CD11b, Arg e IL-10.....	36
3.2.4 Western Blot Para Beta Amiloide (β A)	37
3.2.5 Teor de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	37
3.2.6. Proteína Carbonilada	38
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO.....	71
ANEXO 1 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICO NO USO DE ANIMAIS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE

O conceito moderno de sepse tem se concentrado na resposta humana aos organismos invasores. Em 1991, uma conferência de consenso norte-americana introduziu a ideia de que a sepse é a resposta inflamatória do hospedeiro à infecção (Bone et al. 1992). Para simplificar, a síndrome da resposta inflamatória sistêmica do inglês: *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), foi definida por quatro variáveis: temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e contagem de leucócitos (Vincent et al. 2013). Uma segunda conferência de consenso em 2001 (Levy et al. 2003), tentou rever os critérios da SIRS, mas não conseguiu apresentar uma lista de variáveis fáceis de usar para definir a sepse. Ao expandir a lista de possíveis critérios clínicos, os membros da comissão se arriscaram a tornar a definição menos específica. Tentaram listar critérios maiores e menores, como, por exemplo, para endocardite, mas não conseguiram identificar nenhum critério significativo. Assim, os critérios de 1991 para sepse continuam a ser utilizados (Vincent et al. 2013).

A sepse, atualmente, é definida como uma disfunção orgânica com alto risco de morte, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro ao insulto infeccioso (Singer et al. 2016) que pode ser significativamente amplificado por fatores endógenos (Angus and van der Poll 2013). É uma síndrome de anormalidades fisiológicas, patológicas e bioquímicas induzidas por infecção e tem sido uma grande preocupação de saúde pública (Torio and Andrews 2006). Essa condição abrange muitas causas comuns de hospitalização, como a pneumonia acompanhada por hipoxemia ou infecção do trato urinário complicada por insuficiência renal aguda (Angus et al. 2001). A sepse, pode progredir para um choque séptico, definido como hipotensão induzida pela sepse persistente apesar da ressuscitação fluídica adequada (Bone et al. 1992, Levy et al. 2003, Vincent et al. 2013). O choque séptico é considerado um subgrupo de sepse no qual anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas, particularmente profundas, estão associadas a um risco maior de mortalidade do que com a sepse isolada (Singer et al. 2016, Rannikko et al. 2017).

As complicações clínicas de sepse variam de SIRS a choque séptico e, até mesmo, para síndrome de disfunção múltipla de órgãos. As causas microbianas envolvidas na sepse incluem infecção por bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos ou ambos. Fatores

concomitantes, como diabetes, transplante, intervenção cirúrgica, obstrução crônica doença pulmonar, insuficiência cardíaca congestiva e doença renal podem aumentar a suscetibilidade de uma pessoa à sepse ou agravar sua pontuação clínica (Martin et al. 2003). Citocinas inflamatórias produzidas por leucócitos ativados, como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1a (IL-1a), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e quimiocinas como interleucina 8 (IL-8), também contribuem para a gravidade da sepse (Kumar et al. 1996). Dentre os parâmetros bioquímicos relacionados à sepse, a superprodução de óxido nítrico (NO) causa diminuição do tônus vascular e, conseqüentemente, hipotensão, característica da síndrome de insuficiência cardíaca. Particularmente, a sobrecarga de NO na sepse parece resultar da atividade da NO-óxido sintase induzível (iNOS) do inglês *inducible NO synthase* (Sjakste et al. 2004, Okuyama et al. 2018). Além disso, outras espécies reativas que participam da patogênese da sepse incluem superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$), ácido hipocloroso (HOCl) e o radical hidroxila (OH) (Sjakste et al. 2004, Parihar et al. 2008). O (O_2^-) geralmente é convertido em H_2O_2 pela superóxido desmutase (SOD) contendo manganês (Mn-SOD) e depois para H_2O pela ação da catalase (CAT). Assim, desequilíbrios na relação SOD e CAT, como a superexpressão da primeira enzima ou inibição da última, foram associados ao aumento do estresse oxidativo e morbidade na sepse (Andrades et al. 2005).

Acredita-se que pacientes sépticos apresentam pressão parcial de oxigênio (PO_2) normal no sangue periférico, embora o consumo de oxigênio pelas células possa estar reduzido (Boekstegers et al. 1991, Sair et al. 2001). Esse padrão caracterizado pela incapacidade das células sépticas de utilizar oxigênio foi denominado "hipóxia citofática" (Fink 2001, Crouser 2004). Já foi demonstrado que durante a sepse, a falha energética celular decorrente da disfunção mitocondrial, está associada ao aumento de casos de pacientes críticos durante o quadro de sepse (Brealey et al. 2002, Svistunenko et al. 2006, Carre et al. 2010, Kozlov et al. 2011, Singer 2014) e a melhorar biogênese da mitocôndria melhora a sobrevida do paciente (Carre et al. 2010). Os efeitos patológicos da disfunção mitocondrial resultam depleção de ATP, liberação de proteínas pró-apoptóticas, produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e distúrbios na homeostase de cálcio (Ca^{2+}) (Kozlov et al. 2011).

O diagnóstico de sepse não é uma preocupação nova, desde tempos mais remotos (700 aC), os gregos reconheceram $\Sigma\eta\psi\iota\varsigma$ (sepsis), referindo-se à decomposição ou podridão, como uma condição com risco de vida associada à infecção e com um alto risco de morte. Galeno

e Celsus descreveram os sinais de inflamação como vasodilatação periférica (rubor), febre (calor), dor (dolor), aumento da permeabilidade capilar (tumor) e disfunção orgânica (Vincent et al. 2013). O principal critério para o referido diagnóstico da sepse tem sido, historicamente, a disfunção progressiva do sistema orgânico resultante da infecção (Abraham 2016). Segundo as novas definições, para a operacionalização clínica, a disfunção orgânica presente na sepse pode ser representada por um aumento no escore Sequencial de Avaliação de Falha de Órgão do inglês *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA), de 2 pontos ou mais, o que está associado a uma mortalidade intra-hospitalar maior que 10% (figura 1). Nessa nova definição, alguns termos como septicemia, síndrome séptica e sepse grave foram colocados em desuso (Angus and van der Poll 2013, Singer et al. 2016).

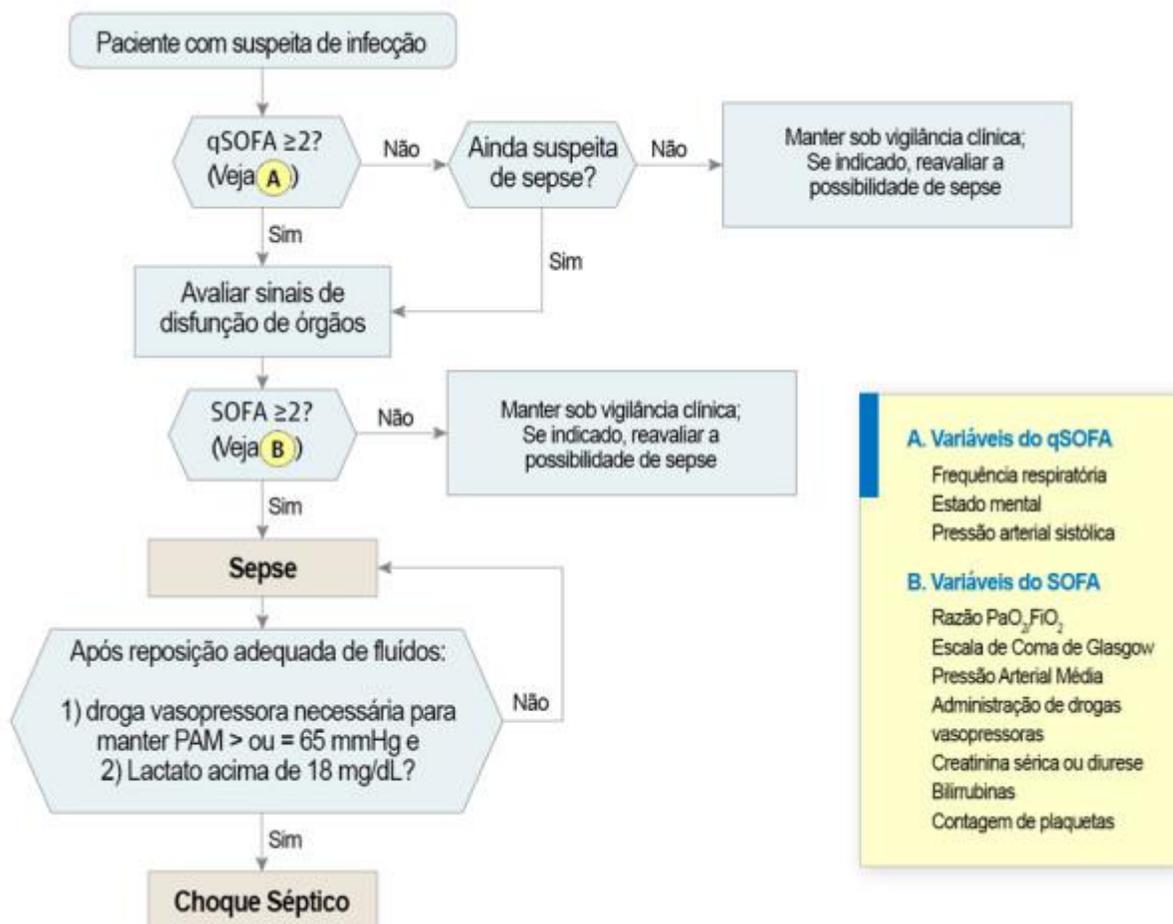


Figura 1. Diagnóstico pelo SOFA. Mostra a disfunção orgânica presente na sepse que pode ser representada por um aumento no escore Sequencial de Avaliação de Falha de Órgão (SOFA). Fonte: Adaptado de ANGOMED. Disponível em: <<http://angomed.com/sepse-novo-consenso-conceito/>>.

Estudos epidemiológicos no Brasil sobre sepse são escassos. O estudo BASES (Brazilian Sepsis Epidemiological Study), desenvolvido em cinco unidades de tratamento intensivo (UTI) dos estados de São Paulo e Santa Catarina, mostrou uma incidência de sepse de 46,9%, sepse grave de 27,3% e choque séptico de 23%. A mortalidade nestes pacientes foi 33,9%, 46,9% e 52,2%, respectivamente (Silva et al. 2004). Outro estudo realizado por Machado et. al (2017) em 227 UTIs, selecionadas aleatoriamente no Brasil, mostrou que de 2.632 pacientes internados nos leitos das unidades 794 tiveram sepse (95%), sendo que desses 55% vieram a óbito (Machado et al. 2017). Nos Estados Unidos um estudo estimou a incidência de sepse em 751.000 casos por ano, os dados obtidos apontam que a idade está diretamente relacionada com a incidência e a mortalidade. A mortalidade em crianças foi de 10% e em pacientes com mais de 85 anos chegou a 38%, sendo responsável por 9,3% de todos os óbitos nos Estados Unidos, resultando em 215.000 mortes, número equivalente à mortalidade por infarto agudo do miocárdio (Angus et al. 2001).

1.2 A SEPSE E ALTERAÇÕES COGNITIVAS EM SOBREVIVENTES

Apesar dos avanços significativos em seu tratamento, a sepse continua sendo uma das principais causas de mortalidade e morbidade. É uma frequente causa de internação em unidade de terapia intensiva (UTI) e também pode se desenvolver em pacientes admitidos na UTI por outros motivos. Além disso, sua incidência tem aumentado nas últimas décadas (Lever and Mackenzie 2007), e a taxa de letalidade hospitalar nos pacientes com sepse permanece elevada (Rivers and Ahrens 2008). Pacientes com sepse também correm risco de complicações, como lesão pulmonar aguda (LPA) e falência de múltiplos órgãos. A sepse isolada, sem essas complicações, também pode ter consequências significativas a longo prazo, secundárias a efeitos em vários sistemas de órgãos, especialmente no sistema nervoso central (SNC), por mecanismos patogênicos, respostas do hospedeiro ou uma combinação de ambos (Martin et al. 2003, Frevert and Martin 2004).

A incidência de sepse em UTI, geralmente, é acima de 30%, com elevadas taxas de mortalidade (Silva et al. 2004). Lesões cerebrais resultantes de sepse grave ocorrem em humanos (Widmann and Heneka 2014) e, após um episódio agudo de falência cerebral reconhecido como *delirium*, até um terço dos pacientes desenvolvem comprometimento de longo prazo equivalente

a lesão cerebral traumática independente da gravidade da doença (Pandharipande et al. 2014). O *delirium* é um marcador de disfunção cerebral aguda associado a UTI, é comum durante a doença crítica e, consistentemente, demonstrou estar associado à morte (Ely et al. 2004, Pisani et al. 2009) e ao comprometimento cognitivo a longo prazo (Girard et al. 2010). Além disso, fatores associados ao *delirium*, incluindo o uso de medicamentos sedativos e analgésicos, também podem contribuir de forma independente para o comprometimento cognitivo a longo prazo (Dubois et al. 2001, Pandharipande et al. 2006).

Dados demonstram que os sobreviventes de sepse têm baixa qualidade de vida (Karlsson et al. 2009, Winters et al. 2010). Há uma crescente compreensão de que os pacientes que sobrevivem à sepse muitas vezes apresentam incapacidades físicas, psicológicas e cognitivas de longo prazo com importantes implicações para a saúde e para vida social. Frequentemente, desenvolvem incapacidade cognitiva e funcional (Iwashyna et al. 2010) necessitando de cuidado contínuo, substancial e de longo prazo (Weycker et al. 2003, Lee et al. 2004). As taxas de mortalidade e morbidade em doenças infecciosas são mais altas em idosos quando comparadas a adultos, e a inflamação sistêmica está emergindo como um fator significativo de declínio cognitivo no cérebro idoso e vulnerável (Angus et al. 2001, High 2004, Cunningham and Hennessy 2015). A imunidade desregulada em indivíduos de meia-idade contribui para o aumento da susceptibilidade à doenças relacionadas ao envelhecimento e afeta a taxa de mortalidade (Silva et al. 2004, d'Avila et al. 2018). Além disso, o cérebro é comumente afetado durante a sepse.

Já foi demonstrado que a inflamação sistêmica aguda (ISA) está associada a um aumento nos níveis do peptídeo beta amiloide (β A) no SNC, por meio da formação de placas senis, presentes na doença de Alzheimer (DA), levando a déficits cognitivos de longo prazo em sobreviventes de sepse (Schwalm et al. 2014). A DA é uma doença neurodegenerativa crônica, sendo considerada a maior causa de demência em idosos (Pierce et al. 2017). A DA ocasiona danos progressivos nas funções cerebrais, que incluem danos de memória, orientação espacial, linguagem, mudanças de comportamento e de personalidade (Vickers et al. 2016). O sintoma mais prevalente na DA é a perda de memória, e posteriormente nas fases mais graves da doença, ocorrem complicações motoras, deixando os indivíduos portadores da doença completamente acamados e dependentes de cuidadores (Howard et al. 2015, Prischmann 2016).

Na doença de Alzheimer, o peptídeo β A se acumula no ambiente extracelular e forma placas amiloides, que causam a morte neuronal (Haapasalo et al. 2010). O β A também é capaz de desencadear a ativação do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), um evento importante na progressão da neurodegeneração (Tan et al. 2009). Nos estágios iniciais da doença de Alzheimer, a micróglia é ativada no cérebro por β A que, por sua vez, são eliminados por ela por meio da fagocitose (Yu and Ye 2015). Após a sepse ocorre um aumento de β A no hipocampo e no córtex pré-frontal (Schwalm et al. 2014). Já o acúmulo de peptídeo β A₁₋₄₂ forma placas extracelulares denominadas “placas senis”, isto ocorre, devido ao aumento e processamento anormal da APP (Buoso et al. 2010). A APP é uma proteína transmembranar altamente expressa em tecidos neuronais humanos. A APP sofre clivagem pelas enzimas α - ou β -secretases, que iniciam duas vias diferentes, a via não amiloidogênica e a via amiloidogênica, respectivamente. Quando APP é clivada pela α -secretase, forma um fragmento extracelular solúvel, sAPP α , sem toxicidade. Quando APP é clivada por β -secretase, gera um fragmento solúvel extracelular, sAPP β , e um fragmento carboxi-terminal CTF99. Este último é ainda clivado pela ação da γ -secretase formando um fragmento β A (Puzzo et al. 2015). O peptídeo β A tende a se agregar formando oligômeros e protofibrilas que posteriormente se agregam dando origem as fibrilas, as quais compõe as placas senis (Lasagna-Reeves et al. 2011, Heppner et al. 2015) (Figura 2).

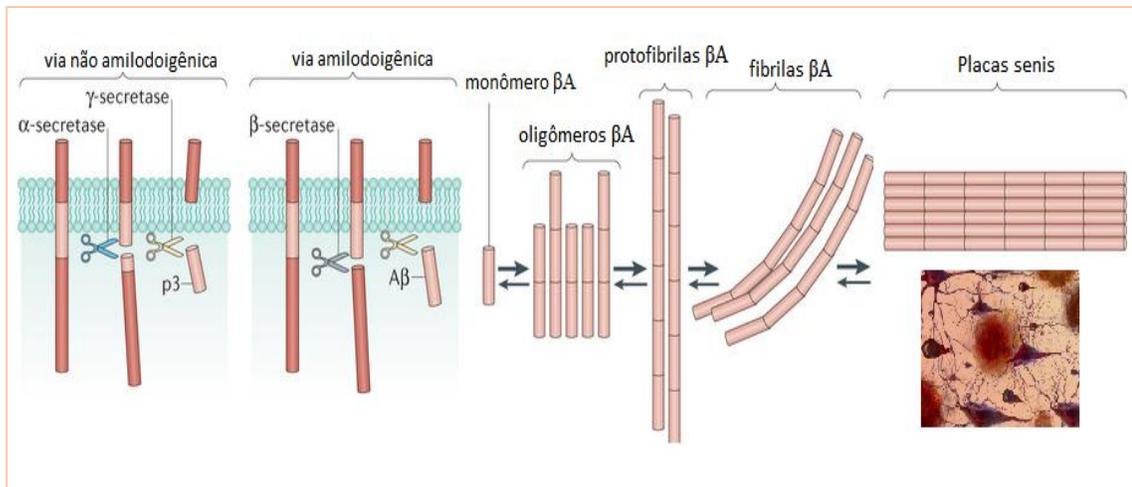


Figura 2. Doença de Alzheimer e peptídeo β A. A APP sofre clivagem pelas enzimas α - ou β -secretases que iniciam duas vias diferentes, a via não amiloidogênica e a via amiloidogênica, respectivamente. Quando APP é clivada pela α -secretase, forma um fragmento extracelular solúvel sem toxicidade. Quando APP é clivada pela β -secretase, gera um fragmento solúvel extracelular, sAPP β , e um fragmento carboxi-terminal CTF99 que é clivado pela ação da γ -secretase formando um fragmento β A. O peptídeo β A (monômero) tende a se agregar formando oligômeros e protofibrilas que posteriormente se agregam dando origem as fibrilas, as quais compõe as placas senis. Fonte: Adaptado de Heppner et al., 2015.

Neste contexto, a inflamação sistêmica está emergindo como um importante motor de declínio cognitivo no cérebro envelhecido e vulnerável. Diferentes comorbidades inflamatórias contribuem para o declínio cognitivo e aumentam o risco de DA (Cunningham and Hennessy 2015). Um crescente número de evidências clínicas e pré-clínicas demonstram que insultos inflamatórios periféricos podem exacerbar a inflamação do SNC (Cunningham et al. 2009, Pandharipande et al. 2013, Pandharipande et al. 2014, Widmann and Heneka 2014). O elevado consumo de oxigênio para a obtenção de energia pode refletir na maior vulnerabilidade do cérebro ao ataque de espécies reativas e à inflamação subsequente (Esiri 2007, Davinelli et al. 2016), uma vez que ocorre desregulação do sistema imunológico, como resultado da produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias (Hsieh and Yang 2013, Fischer and Maier 2015).

1.3 O AVANÇO DA IDADE E AS ALTERAÇÕES DO SNC

O envelhecimento é um processo biológico caracterizado por uma deterioração progressiva das funções fisiológicas e dos processos metabólicos. Essas alterações são caracterizadas por uma perda gradual de desempenho cognitivo e memória (Bishop et al. 2010), e isso pode estar associado à inflamação persistente de baixo grau (Villeda et al. 2011). Embora o envelhecimento não seja uma doença, é um fator de risco significativo para declínio funcional, deficiências afetivas, resposta exagerada a doenças, demência e vulnerabilidade geral para doenças (Hayflick 2007, Seals and Melov 2014). Por outro lado, os eventos de vida associados ao estresse psicológico e à lesão também podem levar a prejuízos e demência acelerados associados ao envelhecimento (Epel et al. 2004, Smith et al. 2013). Estudos recentes sugerem que uma comunicação bidirecional entre o cérebro e o sistema imunológico é crucial para manter a homeostase do SNC. A produção descontrolada de EROs e de citocinas pró-inflamatórias resultam na desregulação do sistema imunológico que acaba sendo um dos mais reconhecidos efeitos do envelhecimento cerebral (Esiri 2007, Davinelli et al. 2016). O número de células nervosas cerebrais durante o processo do envelhecimento é notavelmente reduzido, bem como as alterações no fluxo sanguíneo cerebral que estão associados ao aumento do risco de déficits cognitivos. Também é relatado que ocorre perda neuronal em algumas partes específicas do encéfalo, tais como no *locus ceruleus*, substância negra, hipocampo, núcleo caudado, putâmen e

córtex cerebral (Cesari et al. 2013, Bartsch and Wulff 2015, Zlatar et al. 2016). Essas alterações fisiológicas e anatômicas acabam levando à disfunção de memória, principalmente a memória recente (Izquierdo et al. 1998). Com o envelhecimento ocorre também aumento da incidência de algumas doenças, principalmente das doenças neurodegenerativas, entre elas, a de maior incidência é a DA (Ismail et al. 2011).

Presente no decorrer do envelhecimento o estresse oxidativo se caracteriza por ser um desequilíbrio entre os sistemas anti e pró-oxidantes, apresentando o aumento do número de compostos oxidantes em detrimento às defesas antioxidantes do organismo (Morcillo et al. 1999, Sies 2015, Sies et al. 2017). Tal desequilíbrio apresenta consequências deletérias para a célula, tais como a peroxidação lipídica, a oxidação e consequente inativação de proteínas e lesões oxidativas ao ácido desoxirribonucleico (DNA), podendo levar à perda de função e morte celular (Droge 2002, Halliwell 2006, Gutteridge and Halliwell 2018). A oxidação lipídica prossegue através de um mecanismo de cadeia de radicais livres resultando em muitos produtos finais com a proeminência de aldeídos entre eles. Um dos aldeídos mais estudados é o malondialdeído (MDA) que, entre outras características, atua como um marcador de dano oxidativo em sistemas fisiológicos (Del Rio et al. 2005).

As EROs e espécies reativas ao nitrogênio (ERNs), são radicais livres ou compostos que produzem radicais livres por interação com vários componentes celulares (Lichtenberg and Pinchuk 2015). Durante os processos metabólicos a formação de EROs ou de ERNs, atua como mediadora para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas (Tretter and Adam-Vizi 2005). Em proporções adequadas, sua produção possibilita a geração de trifosfato de adenosina (ATP) por meio da cadeia transportadora de elétrons, a regulação da sinalização celular e a participação de mecanismos de defesa durante o processo inflamatório (Murphy 2009). As EROs contribuem para o aumento de lesões e mutações mitocondriais, o que acabam interferindo, consequentemente, no processo de produção de energia e nas funções vitais da célula. Sabe-se também que as EROs são capazes de gerar danos nas moléculas de DNA e nas proteínas, além de destruir as membranas por meio de reações com os ácidos graxos insaturados, promovendo uma série de reações de peroxidação lipídica e também proteica causando a destruição celular (Grimm et al. 2011).

Uma das marcas do envelhecimento, além do aumento do estresse oxidativo, é a presença de inflamação de baixo grau (Finkel and Holbrook 2000). O termo “envelhecimento por

inflamação” foi elaborado para descrever o estado inflamatório que é característico do processo de envelhecimento e é atribuído à exposição cumulativa a antígenos e ao estresse (Franceschi et al. 2000). O aumento da sinalização inflamatória no envelhecimento é evidente tanto no sistema periférico quanto no sistema nervoso central, estudos de microarranjos do córtex pré-frontal humano adulto e idoso relataram aumento da expressão dependente de idade e de fatores associados à inflamação, tais como, fator nuclear kapa beta (NF-kB), receptor Toll-like -4 (TLR), interleucina 1 (IL-1) e proteína ácida fibrilar glial, do inglês: *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) (Primiani et al. 2014). Da mesma forma, o aumento da IL-6 relacionado à idade, o dano oxidativo e a redução concomitante nos níveis de capacidade antioxidante total foram relatados no líquido cefalorraquidiano de adultos saudáveis (Guest et al. 2014). Essas descobertas indicam um aumento associado à idade na sinalização inflamatória e no estresse oxidativo no cérebro envelhecido e no SNC como um todo.

Existem evidências de deterioração associada ao envelhecimento do sistema imune adaptativo que afeta as funções das células T e B (Gibson et al. 2009, Grubeck-Loebenstein et al. 2009). Essas mudanças são atribuídas à senescência imunológica associada ao envelhecimento, que prejudica a capacidade de combater infecções e produzir anticorpos críticos para a eficácia das vacinas (Grubeck-Loebenstein et al. 2009). Em contrapartida, há evidências que indicam a presença aumentada de células imunes inatas e citocinas circulantes em idosos. Essa mudança pode indicar uma alteração da resposta imune adaptativa antígeno-específica nos indivíduos idosos para uma resposta inata que está associada à inflamação aumentada. Além disso, o aumento do número de monócitos, neutrófilos e níveis elevados de citocinas circulantes têm sido constantemente relatados em indivíduos idosos (Roubenoff et al. 1998, Leng et al. 2005, Tan et al. 2007). A influência de fatores ambientais internos (como doença inflamatória sistêmica) e fatores ambientais externos (como infecção) no SNC é traduzida pelo sistema imunológico na liberação de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios que, por sua vez, afetam caminhos humorais e neurais que transmitem esses sinais para o cérebro (Dantzer et al. 2008, Andersson and Tracey 2012). Os primeiros relatos sobre o envelhecimento mostraram o aumento de IL-1 β , EROs e níveis de peroxidação lipídica que corresponderam ao prejuízo no potencial de longa duração (LTP) no giro denteado de ratos idosos. Há evidência de que o aumento da expressão hipocampal de IL-1 β é um gatilho comum para os comprometimentos induzidos por idade e estresse oxidativo na LTP (Giulian et al. 1986, Murray and Lynch 1998).

As comorbidades crônicas, o envelhecimento e os episódios inflamatórios sistêmicos agudos podem contribuir para a progressão da demência e, neste contexto, a micróglia parece desempenhar um papel importante (Niraula and Sheridan 2017). A micróglia é a principal célula imunológica residente do cérebro. Ela tem por atribuição conferir imunidade inata (Tansey et al. 2007, Taylor et al. 2013). A micróglia residente no cérebro saudável exibe um fenótipo de repouso, entretanto, sofre ativação quando submetida a tensões, como a invasão do patógeno, lesões ou o acúmulo de proteínas tóxicas, iniciando respostas imunes para estimular o reparo dos tecidos, fazendo a detoxificação de detritos e células apoptóticas (Gabrysova et al. 2014). Embora inicialmente consideradas células 'quiescentes' primariamente responsáveis pela remoção de detritos celulares no cérebro, a micróglia agora é conhecida como agente dinâmico na poda sináptica, mantendo a homeostase e a resposta primária a insultos e lesões no SNC (Nimmerjahn et al. 2005, Paolicelli et al. 2011, Lou et al. 2016).

A ativação da micróglia pode levar a uma quebra da barreira hematoencefálica (BHE) e a produção de EROs envolvidas na progressão dos danos no SNC, como ocorre na encefalopatia séptica (Michels et al. 2014). Além de suas funções relacionadas à imunidade, as micróglia são células altamente diferenciadas e participam ativamente da modulação de atividades neuronais (Tremblay et al. 2010, Schafer et al. 2012). A micróglia responde a qualquer perturbação na homeostase do SNC que varia de trauma agudo, envelhecimento normal e múltiplas doenças neurodegenerativas (Ransohoff 2016). Sinais de perigo podem acionar a micróglia e causar transformação em estados ativados, chamados de fenótipos M1 e M2 (Tang and Le 2016). As micróglia ativadas por M1 produzem mediadores pró-inflamatórios e supõe-se que agem como células neurotóxicas (Moehle and West 2015, Tang and Le 2016), enquanto a ativação de M2 é induzida por sinais de células apoptóticas tendo um papel na remodelação e reparo (Hanisch and Kettenmann 2007, Tang and Le 2016). A sepsis em humanos também tem sido associada à ativação microglial (Lemstra et al. 2007). As altas concentrações de mediadores pró-inflamatórios liberados pela micróglia ativada por M1 são potencialmente neurotóxicos e podem não apenas causar efeitos comportamentais agudos reversíveis, como o *delirium*, mas também levar a efeitos prejudiciais persistentes por danos nos neurônios vizinhos (Perry 2004, Teeling and Perry 2009). A resposta microglial fica fora de controle e, por fim, causa neurodegeneração (Paouri and Georgopoulos 2019).

Com o envelhecimento, a micróglia adquire um fenótipo "*priming*", que é caracterizado por uma resposta inflamatória exagerada e descontrolada a um estímulo imunológico (Perry and Holmes 2014). O *priming* de micróglia foi descrito pela primeira vez nos cérebros de animais com doença priônica que foram submetidos a insultos com miméticos de infecção sistêmica, como lipopolissacarídeo (LPS) ou ácido polinossínico-policitídílico (PolyIC) (Combrinck et al. 2002, Field et al. 2010). Diferentes estados cerebrais pré-mórbidos tornam o cérebro mais suscetível a um insulto inflamatório sistêmico agudo (Pandharipande et al. 2013). Esta susceptibilidade está associada à indução de um estado de *priming* de micróglia que pode se apresentar mais ativado, induzindo um estado inflamatório e uma disfunção cerebral mais duradouros (Perry and Holmes 2014, Niraula and Sheridan 2017). Estudos utilizando modelos animais pré-clínicos mostraram que o *priming* de microglia é impulsionado por mudanças em seu microambiente e por liberação de moléculas que impulsionam sua proliferação (Biber et al. 2007). O *priming* torna a micróglia suscetível a um estímulo inflamatório secundário, que pode então desencadear uma resposta inflamatória exacerbada. Esse estímulo pode surgir dentro do SNC, mas em indivíduos idosos, o estímulo secundário mais comumente surge de uma doença sistêmica com um componente inflamatório (Perry and Holmes 2014). Portanto, isso mostra que as alterações imunes centrais e periféricas podem desencadear o *priming* de micróglia que exibe uma resposta inflamatória exagerada em resposta a um insulto imune moderado.

Contudo, um dano cerebral pode influenciar o processo de envelhecimento induzindo alterações gliais e neuronais, principalmente por induzir neuroinflamação, impactando na saúde mental do indivíduo idoso o que acaba contribuindo para a menor qualidade de vida do mesmo.

1.4 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços significativos em seu tratamento, a sepse continua sendo uma das principais causas de mortalidade e morbidade. Há uma crescente compreensão de que os pacientes que sobrevivem à sepse muitas vezes apresentam incapacidades físicas, psicológicas e cognitivas de longo prazo com importantes implicações para a saúde e para vida social. Pacientes sépticos, frequentemente, desenvolvem incapacidade cognitiva e funcional (Iwashyna et al. 2010) necessitando de cuidado contínuo, substancial e de longo prazo (Weycker et al. 2003, Lee et al. 2004). As taxas de mortalidade e morbidade em doenças infecciosas são mais altas em idosos quando comparadas a adultos, e a inflamação sistêmica está emergindo como um fator significativo de declínio cognitivo no cérebro com o avanço da idade (Angus et al. 2001, High 2004, Cunningham and Hennessy 2015). Diante desses fatores se torna relevante a busca por maior compreensão dos mecanismos envolvidos na sepse que possam vir a causar prejuízo ao SNC e comprometendo a memória, cognição e a qualidade de vida de pacientes acometidos por sepse. Este estudo foi realizado em ratos *Wistars* machos e os dados obtidos serão utilizados para ajudar na compreensão da doença em humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o papel aditivo da sepse e da idade na inflamação cerebral e progressão das alterações de memória induzidas pela inflamação sistêmica

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a memória não-aversiva por meio do teste comportamental de Reconhecimento do Objeto Novo em ratos Wistar machos com 2 meses de idade observados 60 ou 90 dias após ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia simulada;
- Avaliar comportamento do tipo depressivo por meio do teste comportamental do Nado Forçado em ratos Wistar machos com 2 e 6 meses de idade observados 30 dias após CLP ou cirurgia simulada;
- Avaliar memória aversiva por meio do teste comportamental de Esquiva Inibitória em ratos Wistar machos com 2 e 6 meses de idade observados 30 dias após CLP ou cirurgia simulada;
- Avaliar os níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β , e IL-6,) em córtex pré-frontal e hipocampo de ratos Wistar machos com 2 meses de idade observados 60 ou 90 dias após CLP ou cirurgia simulada;
- Avaliar os níveis de citocinas (IL-1 β , e IL-6,) em córtex pré-frontal e hipocampo de ratos Wistar machos com 2 e 6 meses de idade observados 30 dias após CLP ou cirurgia simulada;
- Avaliar a atividade de Mieloperoxidase (MPO) em córtex pré-frontal e hipocampo de ratos Wistar machos com 2 meses de idade observados 60 ou 90 dias após CLP ou cirurgia simulada;
- Avaliar marcadores fenotípicos microgliais (IBA-1, Inos, CD11b, Arg e IL-10) por imunohistoquímica em hipocampo de ratos Wistar machos com 2 e 6 meses de idade observados 30 dias após CLP ou cirurgia simulada;

- Avaliar os níveis de Beta Amilóide (β A) em córtex pré-frontal e hipocampo de ratos Wistar machos com 2 e 6 meses de idade observados 30 dias após CLP ou cirurgia simulada e de animais com 2 meses observados 60 ou 90 dias;
- Avaliar os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e dano oxidativos a proteínas (proteína carbonilada) em córtex pré-frontal e hipocampo de ratos Wistar machos com 2 e 6 meses de idade observados 30 dias após CLP ou cirurgia simulada;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

3.1.1 Ética

Os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo comitê de ética da UNESC (número de protocolo: 041-2016 / 1). Neste estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos com 2 e 6 meses de idade procedentes do biotério da UNESC. Os ratos permaneceram abrigados em 5 animais por caixa com acesso ao alimento e à água *ad libitum* e foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e temperatura de $23\pm 1^\circ\text{C}$.

3.1.4 Indução de Sepses - Modelo de ligadura e perfuração Cecal (CLP)

Os ratos *Wistar* de 2 e 6 meses de idade foram submetidos ao CLP. Resumidamente, os animais foram anestesiados utilizando uma mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) administrada por via intraperitoneal. Em condições assépticas, foi realizada uma laparotomia da linha média para expor o ceco e o intestino adjacente. O ceco foi ligado com uma sutura com fio 3.0 na base, abaixo da válvula ileocecal, e foi perfurado uma vez com uma agulha de calibre 14. O ceco foi então espremido suavemente para extrudir uma pequena quantidade de fezes através do local da perfuração. O ceco foi retornado para a cavidade peritoneal, e a laparotomia foi fechada. Os animais foram ressuscitados com solução salina regular imediatamente e 12 h após CLP. Todos os animais receberam antibióticos (ceftriaxona a 30 mg/kg e clindamicina 25 mg/kg) a cada 6 h via subcutânea (s.c) e dipirona sódica via intraperitoneal (i.p) (80mg / kg) como analgésico. Para minimizar a variabilidade entre diferentes experimentos, o procedimento CLP foi realizado pelo mesmo investigador. A taxa de mortalidade média foi de 40%, o que é compatível com a sepsis.

3.1.3 Delineamento experimental

Os animais com 2 meses de idade, foram submetidos ao CLP ou cirurgia simulada (Sham) e foram observados por 60 ou 90 dias após o procedimento. Na etapa 1, nos dias 60 e 61 e na etapa 2, nos dias 90 e 91, foram submetidos ao teste comportamental de reconhecimento ao

objeto novo e, após o término do comportamento, no último dia, sofreram eutanásia e uma parte dos animais tiveram as estruturas do córtex pré-frontal e hipocampo dissecadas do cérebro para as análises bioquímicas e a outra foi submetida à perfusão para posterior análise imunohistológica. Na etapa 3 do estudo, animais com 2 e 6 meses de idade, foram submetidos ao CLP ou cirurgia simulada (Sham) e foram observados por 30 dias após o procedimento, nos dias 30 e 31 foram submetidos aos testes comportamentais de nado forçado e esquiva inibitória e, após o término do comportamento, no último dia, sofreram eutanásia e tiveram as estruturas do córtex pré-frontal e hipocampo dissecadas do cérebro para as análises bioquímicas. Todo o material biológico foi armazenado em -80°C .

Os animais pertencentes as etapas 1 e 2, foram divididos em grupos experimentais com $n=15$:

- 1: Animais com idade de 2 meses observados por 60 dias após serem submetidos a cirurgia simulada (Sham);
- 2: Animais com idade de 2 meses observados por 60 dias após serem submetidos ao CLP;
- 3: Animais com idade de 2 meses observados por 90 dias após serem submetidos a cirurgia simulada (Sham);
- 4: Animais com idade de 2 meses observados por 90 dias após serem submetidos ao CLP.

Os animais pertencentes a etapa 3, foram divididos em grupos experimentais com $n=20$:

- 1: Animais com idade de 2 meses observados por 30 dias após serem submetidos a cirurgia simulada (Sham);
- 2: Animais com idade de 2 meses observados por 30 dias após serem submetidos ao CLP;
- 3: Animais com idade de 6 meses observados por 30 dias após serem submetidos a cirurgia simulada (Sham);
- 4: Animais com idade de 6 meses observados por 30 dias após serem submetidos ao CLP.

Os testes comportamentais foram realizados em etapas, de acordo com o tempo após o CLP ou cirurgia simulada, etapas 1 e 2 (figura 1 e 2):

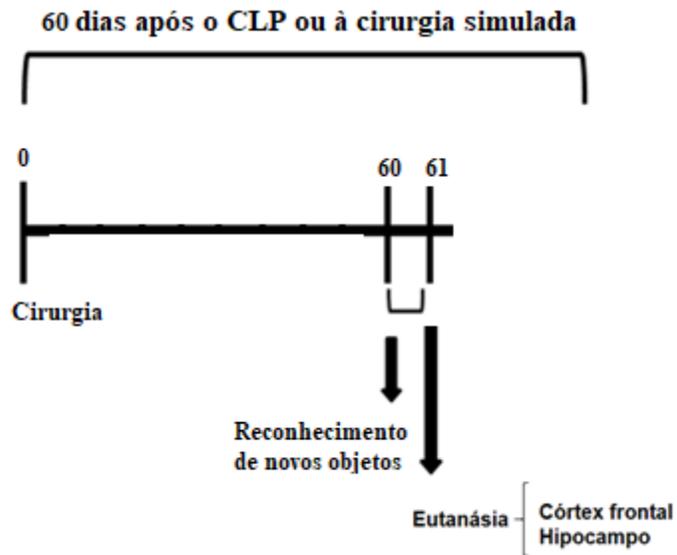


Figura 3. Desenho experimental. Etapa 1: animais com idade de 2 meses observados 60 dias após procedimento cirúrgico.

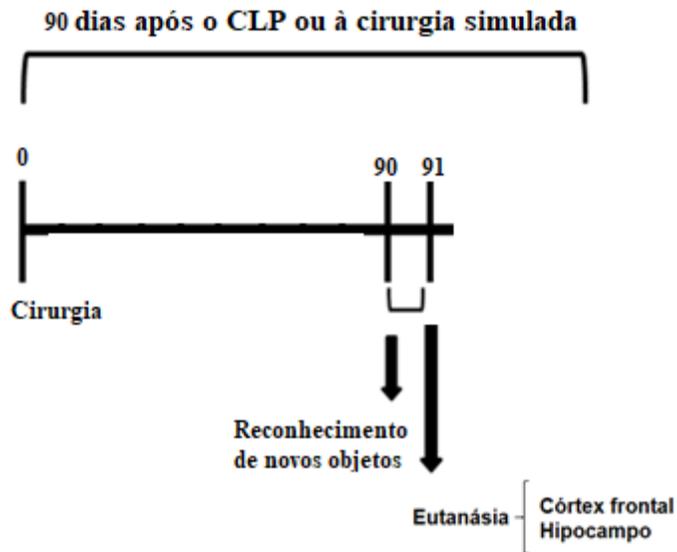


Figura 4. Desenho experimental. Etapa 2: animais com idade de 2 meses observados 90 dias após procedimento cirúrgico.

Os testes comportamentais foram realizados 30 após o CLP ou cirurgia simulada, etapas 3:

3.1.5 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado foi conduzido de acordo com os protocolos já estabelecidos na literatura (Porsolt et al. 1977, Ortmann et al. 2016). Os animais da etapa 3 do estudo, com 2 e 6 meses de idade observados 30 dias após o CLP, foram submetidos a este teste. O teste envolve duas exposições a um tanque cilíndrico preenchido com água, de tal forma que os ratos não podem tocar o fundo do tanque nem escapar. O tanque possui 80 cm de altura, 30 cm de largura e foi preenchido com água (22-23 ° C) até uma profundidade de 40 cm. Os ratos foram colocados individualmente no cilindro durante 15 minutos (sessão de pré-teste). Após 60 minutos, eles foram novamente submetidos ao teste de nado forçado por cinco minutos (sessão de teste). O tempo de imobilidade dos ratos foi registrado em segundos por um observador experiente.

3.1.6 Esquiva inibitória

Durante as sessões de teste para o teste de esquiva inibitória, os ratos da terceira etapa do estudo com 2 e 6 meses de idade, observados 30 dias após o CLP, foram colocados na plataforma e sua latência para descer na grade com todas as quatro patas foi medida usando um dispositivo automático. Imediatamente depois de pisar na grade, os animais receberam um choque de 0,4 mA por 2s e foram devolvidos às suas gaiolas. O teste de retenção foi realizado 24 horas após a sessão de teste. O procedimento para o teste de retenção foi idêntico ao da sessão de teste, exceto que nenhum choque foi administrado. Durante o teste de retenção foi utilizada a latência (máximo = 180 s) para avaliar a retenção da memória de esquiva inibitória (Izquierdo et al. 1998, Roesler et al. 1999).

3.1.7 Eutanásia

Os animais de todas as etapas (1, 2 e 3) do estudo foram submetidos à eutanásia logo após a avaliação comportamental, por decapitação na guilhotina. Os animais ficaram aguardando a eutanásia na sala ao lado para evitar que sentissem o cheiro do sangue e a guilhotina foi lavada em água corrente entre cada eutanásia. O córtex pré-frontal e hipocampo foram dissecados para posteriores análises bioquímicas. Parte dos animais das etapas 1 e 2 foram submetidos à perfusão

cardíaca para análise imunohistoquímica. As amostras, exceto as utilizadas para imunohistoquímica, foram armazenadas com refrigeração à -80°C .

3.2 TESTES BIOQUÍMICOS

3.2.1 Níveis De Citocinas

Amostras de córtex pré-frontal e hipocampo foram homogeneizadas em tampão fosfato. Os níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6) dos animais das etapas 1 e 2 do presente estudo e as citocinas (IL-1 β , IL-6) dos animais da etapa 3, foram quantificadas por kits de imunoenensaio enzimático (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), conforme as recomendações do fabricante, descritas a seguir. As placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram incubadas durante a noite com o anticorpo de captura. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato de lavagem, e em seguida, foram bloqueadas com uma solução de tampão fosfato com albumina 1% durante 1 hora. Após, foram incubadas as amostras homogeneizadas e a curva padrão, diluídas em solução tampão, durante 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e, em seguida, incubadas com anticorpo de detecção por mais 2 horas. Depois das lavagens, foi incubado uma peroxidase conjugada com estreptavidina por 20 minutos, e após o substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, 1:1), e a reação foi finalizada pela adição de ácido sulfúrico 2N. As placas foram lidas à 450nm em espectrofotômetro. A proteína total foi mensurada de acordo com o método de Lowry (Lowry et al. 1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

3.2.2 Atividade De Mieloperoxidase (MPO)

As estruturas do córtex pré-frontal e do hipocampo dos animais submetidos a sepse com idade de 2 meses e observados 60 e 90 dias após a cirurgia (etapas 1 e 2), foram homogeneizados (50mg/ml) em 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). Uma alíquota de sobrenadante foi misturada com uma solução de 1,6 mM de TMB e 1 mM de H₂O₂. A atividade de MPO foi medida espectrofotometricamente a 650nm a 37 °C. Os resultados foram expressos como mU / mg de proteína (De Young et al. 1989).

3.2.3 Imunohistoquímica IBA-1, iNOS, CD11b, Arg e IL-10

Para caracterizar os fenótipos microgliais, a imunohistoquímica (IH) foi realizada. Animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (30 e 10 mg/kg i.p). Uma incisão foi realizada no abdomen ao longo do diafragma seguido de um corte da caixa torácica até a clavícula em ambos os lados das costelas, proporcionando uma visão clara do coração. Uma pequena incisão foi feita na extremidade posterior do ventrículo esquerdo e uma agulha de perfusão foi inserida através do ventrículo para se estender em linha reta cerca de 5 mm. Foi feita uma incisão no átrio direito do rato para criar uma saída para o fluxo livre da solução. Um hemostato foi usado para estabilizar a agulha e pinçar a aorta descendente para otimizar a perfusão no SNC. Animais foram perfundidos com solução salina estéril a 0,9% por 10 minutos (taxa de fluxo de 20 mL / min), seguidos por 10 minutos com solução de paraformaldeído (PFA) a 4% em PBS (pH 7,4) (taxa de fluxo de 20 mL / min). Os cérebros foram então cuidadosamente extraídos e mantidos em PFA a 4% por 24 h a 4 ° C, colocados em sacarose a 15% por 24 h a 4 ° C e depois colocados em sacarose a 30% por 24 h a 4 ° C. Os cérebros foram levemente secos e congelados a -20 ° C. As secções de 40 µm do hipocampo dos animais submetidos a sepse com idade de 2 meses e observados 60 e 90 dias após a cirurgia (etapas 1 e 2), foram incubadas em 0,5% de peróxido de hidrogênio em PBS 0,1 M (pH 7,4) contendo 0,3% de Triton-X100 (PBST) durante 30 min a temperatura ambiente para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Após a lavagem com PBST, as secções foram incubadas durante 30 min com PBST contendo 2% de albumina de soro bovino para bloquear a ligação de proteína não específica. As secções foram então incubadas durante a noite a 4 ° C com um anticorpo IgG monoclonal de coelho contra IBA-1 (diluição 1: 100) ou um anticorpo IgG monoclonal de coelho contra CD11-b (diluição 1: 4000) ou anticorpo policlonal de coelho contra iNOS (1: Diluição 100, Abcam, Cambridge, MA), IL-10 (diluição 1: 200, Abcam, Cambridge, MA) ou arginase (diluyente 1: 200, Abcam, Cambridge, MA). Após a lavagem com PBST, as secções foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 h com IgG anti-coelho biotilado (diluição 1: 100, Abcam). As secções foram incubadas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Spring Bioscience). Dezesesseis imagens aleatórias por seção cerebral foram adquiridas em uma ampliação de $\times 100$ e a área imunopositiva foi expressa como porcentagem da área total analisada. Serão contadas apenas células imunopositivas com

características morfológicas da microglia. Foram utilizados controles positivos em todos os grupos, de acordo com a bula de cada anticorpo.

3.2.4 Western Blot para o Peptídeo Beta Amilóide (β A)

Para realizar a imunotransferência foram homogeneizadas amostras de tecido do córtex pré-frontal e hipocampo (n = 5 por grupo) dos animais de todas as etapas (1, 2 e 3), em tampão Laemmli (TrisHCl 62,5 mM, pH 6,8, dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1% (p / v), 10% (V / v) glicerol) e quantidades iguais de proteína (30 mg / poço) foram submetidas a eletroforese por eletroforese em gel de poliácridamida - dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose. A eficiência da transferência eletrolítica foi então verificada por coloração com Ponceau S e a membrana foi bloqueada na solução salina tampão Tris-Tween (TTBS: 100mMTriseHCl, pH 7,5, contendo 0,9% de NaCl e 0,1% de Tween 20) com 5% de albumina. As membranas foram incubadas durante a noite a 4 ° C com anti- β -amilóide policlonal de coelho da Sigma-Aldrich (peso molecular do anticorpo: 4 kDa). A IgG anti-coelho secundária foi incubada com a membrana durante 2 h (1: 1000). A membrana foi então lavada novamente com TTBS e a imunorreatividade foi detectada por quimioluminescência utilizando quimiluminescência comumente aprimorada (ECL). A análise da densitometria dos filmes foi realizada usando o software de análise de imagem Image Jv.1.34. Todos os resultados serão expressos como uma relação relativa entre pTrkB anti- β amilóide e imunocontos GAPDH.

3.2.5 Níveis de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para determinar o dano oxidativo lipídico, a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi medida em hipocampo e córtex pré-frontal dos animais com idade de 2 e 6 meses observados 30 dias após a indução ou não da sepse (Draper and Hadley 1990). As amostras foram misturadas com 1 ml de solução tricloroacética a 10% ácido e 1 ml de ácido tiobarbitúrico a 0,67%, e depois aquecidos num banho de água a ferver durante 30 min. A formação de TBARS foi determinada espectrofotometricamente a 532 nm. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído (MDA) / mg de proteína.

3.2.6. Proteína Carbonilada

O dano oxidativo às proteínas foi medido em hipocampo e córtex pré-frontal dos animais com idade de 2 e 6 meses observados 30 dias após a indução ou não da sepse pela avaliação dos grupos carbonila com base em sua reação com dinitrofenilhidrazina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), conforme descrito anteriormente (Levine et al. 1990). A absorvância foi lida a 370 nm. Os resultados foram expressos como proteínas carbonilas / mg de proteína.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados bioquímicos e do nado forçado foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido do teste *post hoc* de Tukey. Os dados da tarefa de reconhecimento de objetos e esQUIVA inibitória foram relatados como mediana e intervalos interquartis, e as comparações entre os grupos foram realizadas usando testes U de Mann-Whitney. Todos os testes foram analisados com SPSS versão 20 ou GraphPad Prism 4.0. Software Inc., E.U.A. Em todas as comparações, $p < 0,05$ indicou significância estatística. Western blotting e imuno-histoquímica foram analisado pelo ImageJ v1.34, Instituto Nacional de Saúde, EUA. Os dados foram expressos como média + erro padrão da média.

4 RESULTADOS

A figura 6 (A e B) apresenta os resultados do teste de reconhecimento de novos objetos realizado com os animais das etapas 1 (60 dias após o CLP), e etapa 2 (90 dias após o CLP) (Fig. 6A). Diferentemente de 60 dias, 90 dias após a cirurgia, os animais sépticos apresentaram um comprometimento de memória de reconhecimento de novos objetos (Fig. 6B).

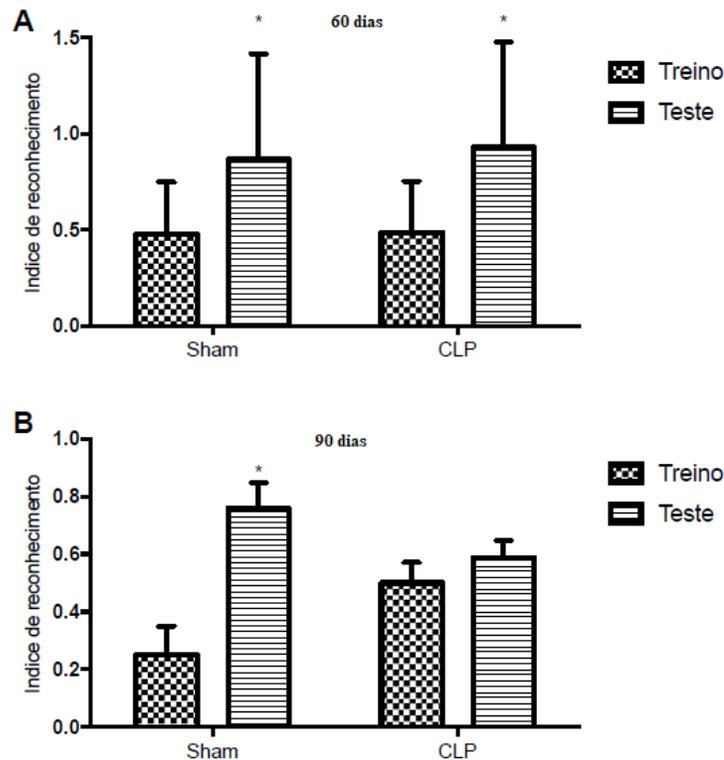


Figura 6. Efeito do CLP na memória de reconhecimento de novos objetos. (A) 60 dias; (B) 90 dias. O índice de reconhecimento é apresentado como mediana e intervalos interquartis, * $p < 0,05$ quando comparados o teste versus treino.

Para testar a hipótese de que a idade determina piores desfechos comportamentais em sobreviventes à sepse, a função cognitiva e sintomas semelhantes à depressão foram avaliados em ratos jovens (2 meses) e adultos (6 meses). Durante a tarefa de esquiava inibitória, houve um aumento significativo na latência nos grupos Sham jovens e adultos (Fig. 7A), demonstrando a que houve a formação da memória. Não houve aumento significativo na latência nos animais com 2 meses e 6 meses de idade submetidas ao CLP durante o teste, o que se torna um indicador de disfunção cognitiva. Esse déficit foi semelhante entre esses animais (fig. 7A).

O tempo de imobilidade no teste de natação forçada também aumentou no grupo CLP, sugerindo um comportamento do tipo depressivo (fig. 7B). Ao contrário do teste de esQUIVA inibitória, houve um aumento significativo no tempo de imobilidade em animais CLP com 6 meses de idade quando comparados com animais CLP com 2 meses de idade (Fig. 7B).

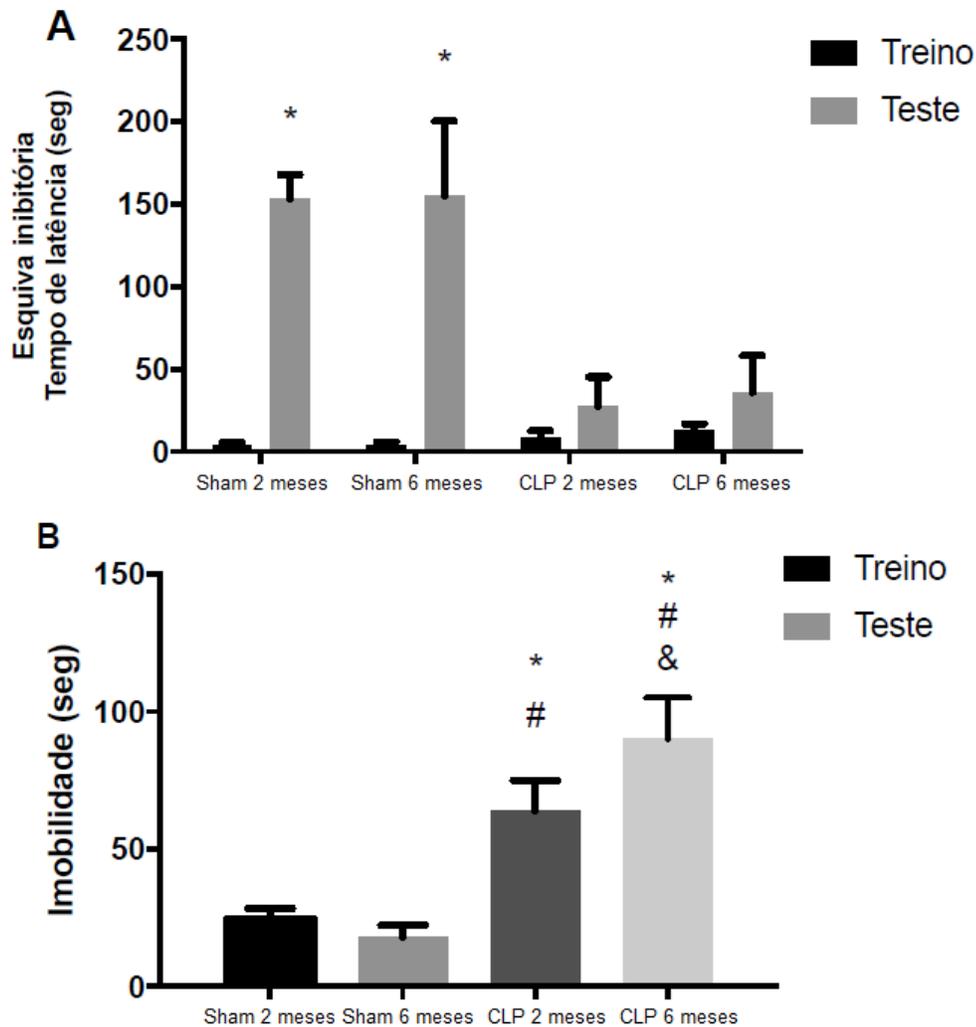


Figura 7. Efeito da idade no comprometimento cognitivo a longo prazo após sepse. A sepse foi induzida por CLP e 30 dias depois, os animais foram submetidos ao teste de esQUIVA inibitória (A) e ao teste de nado forçado (B). Os dados são apresentados como mediana e intervalos interquartis. *estatisticamente diferente do treino (esQUIVA inibitória). *estatisticamente diferente de Sham com 2 meses de idade; #diferente de Sham 6 meses de idade, &diferente de Sham 6 meses de idade (nado forçado). Teste de esQUIVA inibitória: teste de Mann-Whitney e Wilcoxon. Teste de nado forçado: ANOVA *post hoc* Tukey; $p < 0,05$.

Posteriormente foram avaliados os diferentes marcadores de inflamação cerebral nos animais das etapas 1 e 2 (60 e 90 dias após a CLP). No hipocampo dos animais sépticos com 90

dias após o CLP, houve o aumento dos níveis de TNF- α e de IL-1 β (fig. 8A e C). Os níveis de IL-1 β também estavam aumentados no hipocampo dos animais CLP de 60 dias (fig. 8 C). Os níveis de IL-6 estavam aumentados no hipocampo dos animais CLP de 60 dias quando comparados aos Sham também de 60 dias (fig. 8E). A atividade de MPO estava aumentada no hipocampo dos animais CLP com 60 e 90 dias (fig. 8G).

No córtex pré-frontal, os níveis de TNF- α e atividade de MPO foram igualmente aumentados em 60 e 90 dias em animais sépticos (fig. 8 B e H). Os níveis de IL-1 β e IL-6 aumentaram significativamente quando comparados os animais sépticos de 60 e os sépticos com 90 dias de observação (fig. 8 D e F).

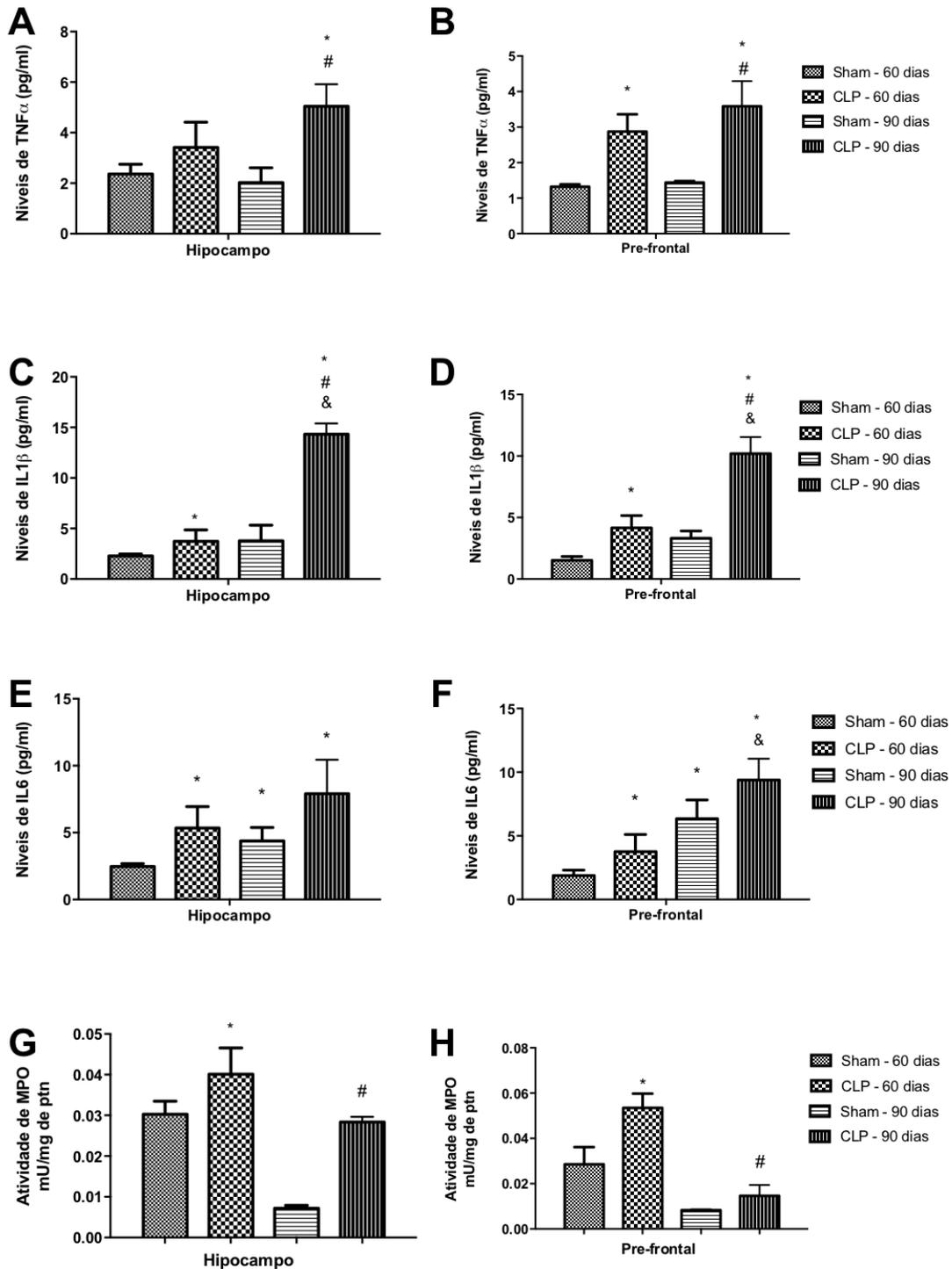


Figura 8. Parâmetros inflamatórios no hipocampo e no córtex pré-frontal 60 e 90 dias após a indução da sepse. A) TNF- α - hipocampo; B) TNF- α - pré-frontal; C) IL-1 - Hipocampo; D) IL-1 β - pré-frontal; E) IL-6 - hipocampo F) IL-6 - pré-frontal; G) níveis de mieloperoxidase - hipocampo e H) níveis de mieloperoxidase - pré-frontal. Com n = 8 por grupo. p < 0,05 denotou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. *Diferente do Sham 60 dias; # Diferente de Sham de 90 dias; & diferente de CLP 60 dias. Os dados foram analisados pelo ImageJ v1.34, Instituto Nacional de Saúde, EUA. Os dados foram expressos como média + erro padrão da média.

Os níveis de IL-1 β (Fig. 9A) e IL-6 (Fig. 9B) foram aumentados em ambas as estruturas em animais Sham com 6 meses de idade em comparação com animais Sham com 2 meses de idade observados 30 dias após a CLP. No hipocampo, os níveis de IL-1 β em animais sépticos com 2 meses de idade foram similares aos animais Sham com 6 meses, mas maiores quando comparados com animais Sham jovens. Curiosamente, no hipocampo, os níveis de IL-6 e IL-1 β foram significativamente maiores em animais sépticos com 6 meses de idade em comparação com animais sépticos com 2 meses de idade, e os níveis de IL-1 β foram mais elevados em 6 meses de idade em animais CLP em comparação com animais Sham da mesma idade (Fig. 9A e 9B).

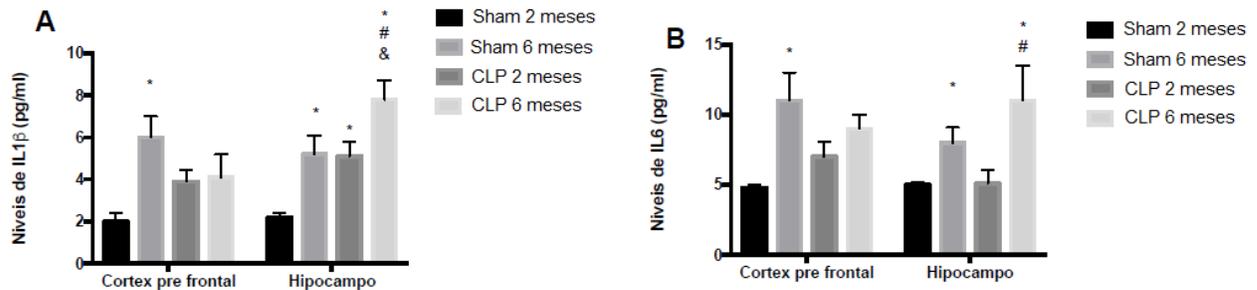
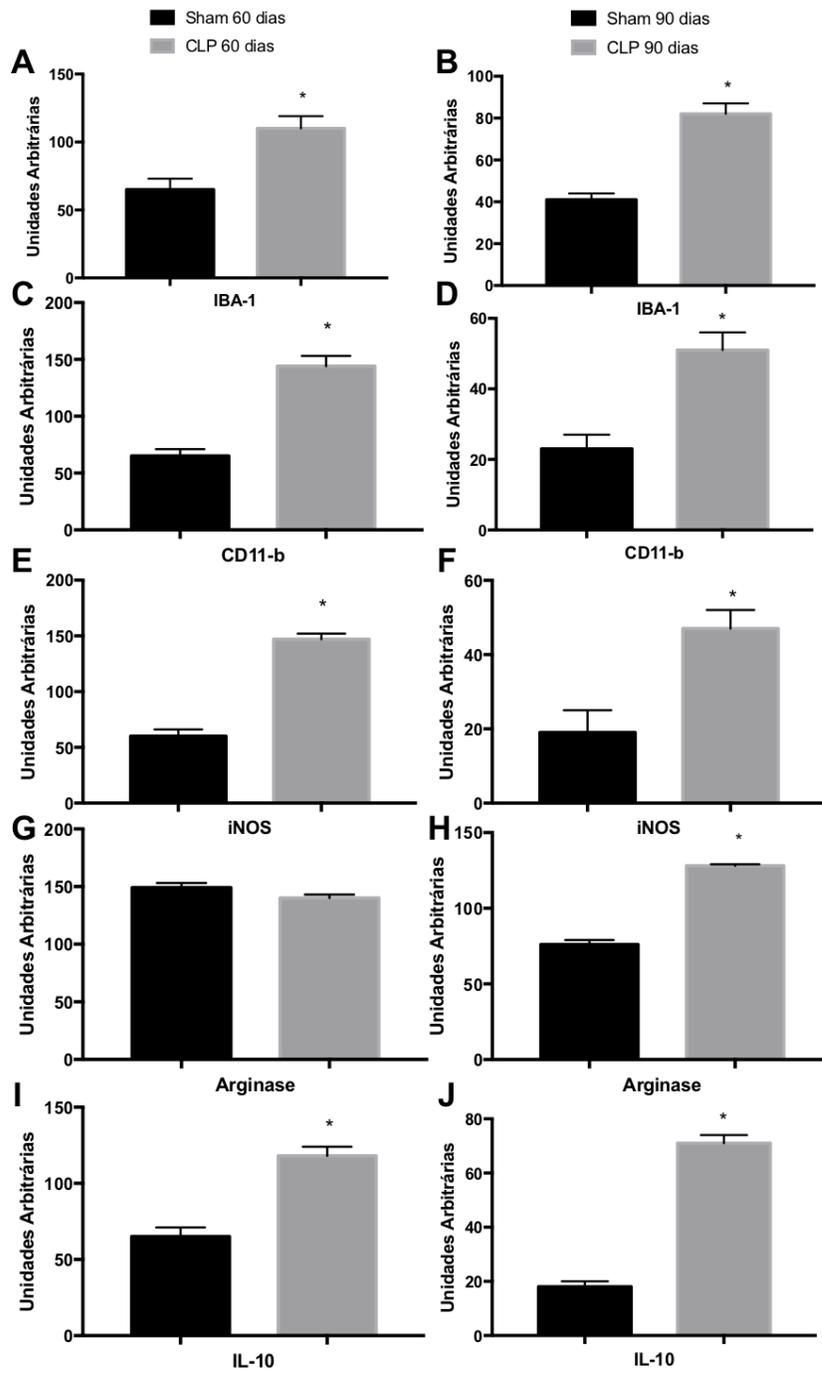


Figura 9. Efeitos da idade na inflamação cerebral após a indução da sepse. A sepse foi induzida por ligadura e perfuração cecal em animais com 2 e 6 meses de idade. Os marcadores de inflamação IL1 β (A) e IL-6 (B) foram medidos no córtex pré-frontal e no hipocampo. n = 6 *estatisticamente diferente de Sham com 2 meses de idade; #diferente do CLP com 2 meses de idade; &diferente de Sham com 6 meses de idade. Os dados foram avaliados por ANOVA *post hoc* Tukey; p <0,05.

Para caracterizar ainda mais a inflamação cerebral tardia, após a indução da sepse, determinou-se a ativação da micróglia e os fenótipos da micróglia por imunohistoquímica do hipocampo dos animais submetidos a cirurgia aos 2 meses de idade. Os animais observados aos 60 e 90 dias após a indução da sepse, apresentaram uma ativação sustentada de micróglia, visto por um aumento nas células positivas IBA-1 (Fig. 10 A e B). A ativação microglial foi associada a fase M1 (iNOS e CD11b) (Fig. 10 C; D; E e F) e M2 (IL-10 e arginase) 60 e 90 dias após a indução da sepse (Fig. 10 I e J).



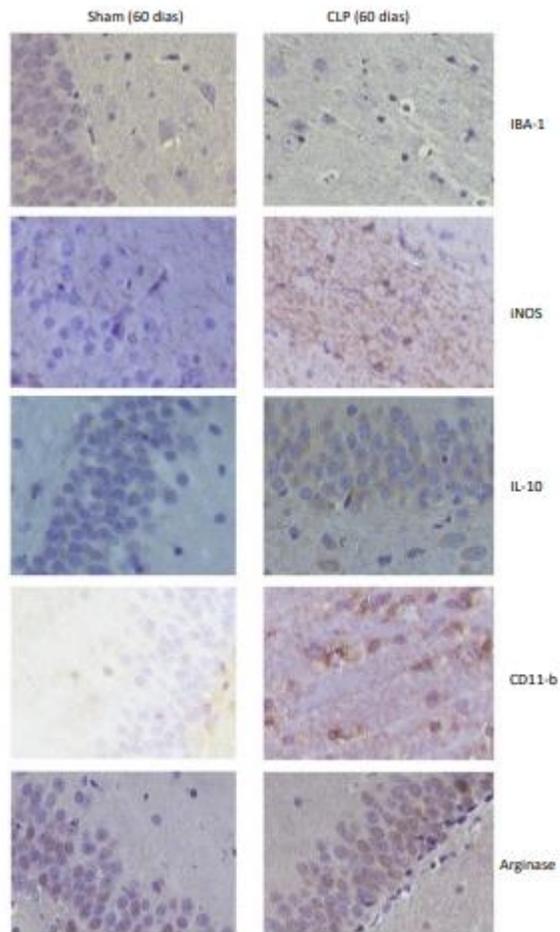


Figura 10. IBA-1 (A - 60 dias e B - 90 dias), CD11-b (C - 60 dias e D - 90 dias), iNOS (E - 60 dias e F - 90 dias); Arginase (G - 60 dias e H - 90 dias) e IL - 10 (I - 60 dias e J - 90 dias), por imunohistoquímica em hipocampo de animais submetidos a sepse. * $p < 0,05$. $n = 5$. Ampliação original: $\times 400$. Os dados foram expressos por unidades arbitrárias (ImageJ software v1.34, National Institute of Health, EUA) e os dados foram expressos como média + erro padrão da média.

Anteriormente, demonstramos que as alterações cerebrais de longo prazo observadas em ratos sobreviventes à sepse estavam associadas a um aumento nos níveis de βA (Schwalm et al. 2014). Assim, também foram medidos os níveis de βA o hipocampo e córtex pré-frontal em 60 e 90 dias após o CLP. Houve um aumento nos níveis de βA após a indução da sepse, aos 60 dias após o CLP no hipocampo e córtex pré-frontal e apenas no hipocampo em 90 dias (Fig. 11).

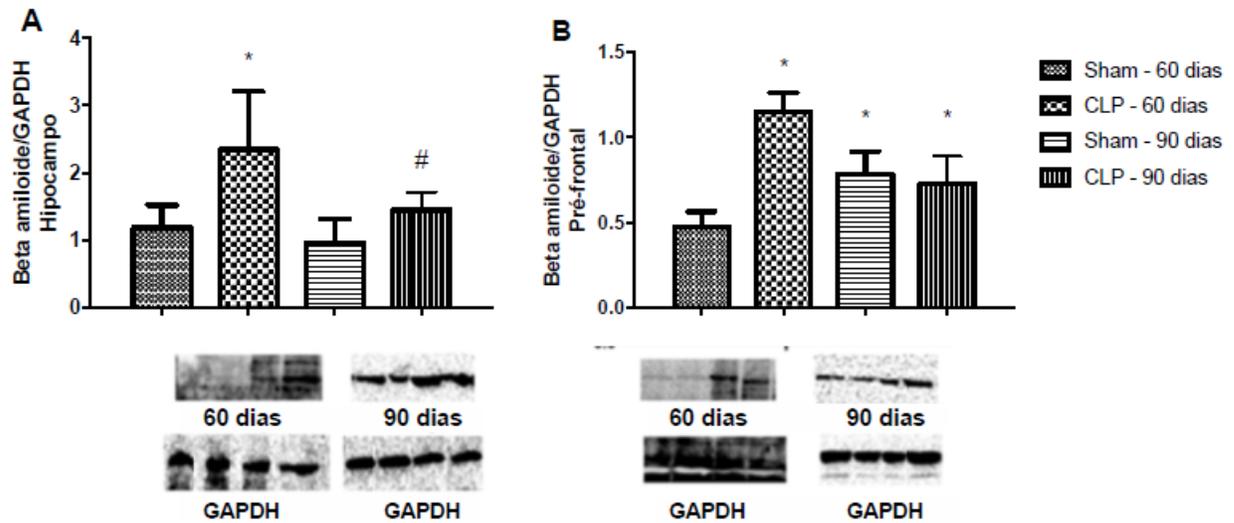


Figura 11. Níveis de β A no hipocampo e no córtex pré-frontal após a indução da sepse. Os animais foram submetidos a CLP ou cirurgia simulada (Sham) e 60 ou 90 dias após a cirurgia os animais foram eutanasiados e o hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) foram removidos para a determinação dos níveis de beta-amiloide. As imunotransferências representativas de amostras individuais de diferentes animais são mostradas. Os dados foram expressos como média \pm DP. $n = 4$ cada grupo. $p < 0,05$ denotou diferença estatisticamente significante entre os grupos. * Diferente do Sham 60 dias; #Diferente do Sham de 90 dias.

O conteúdo de β A em ratos com 2 e 6 meses de idade, submetidos ou não a sepse, também foi medido por meio de Western Blotting. Os níveis de β A estavam significativamente aumentados no hipocampo de ratos Sham com 6 meses de idade quando comparados com os Sham de 2 meses de idade (Fig. 12B). Além disso, apenas os animais com 6 meses de idade apresentaram aumento dos níveis de β A em ambas as estruturas quando comparados aos animais com 2 meses de idade (fig. 12A e 12B).

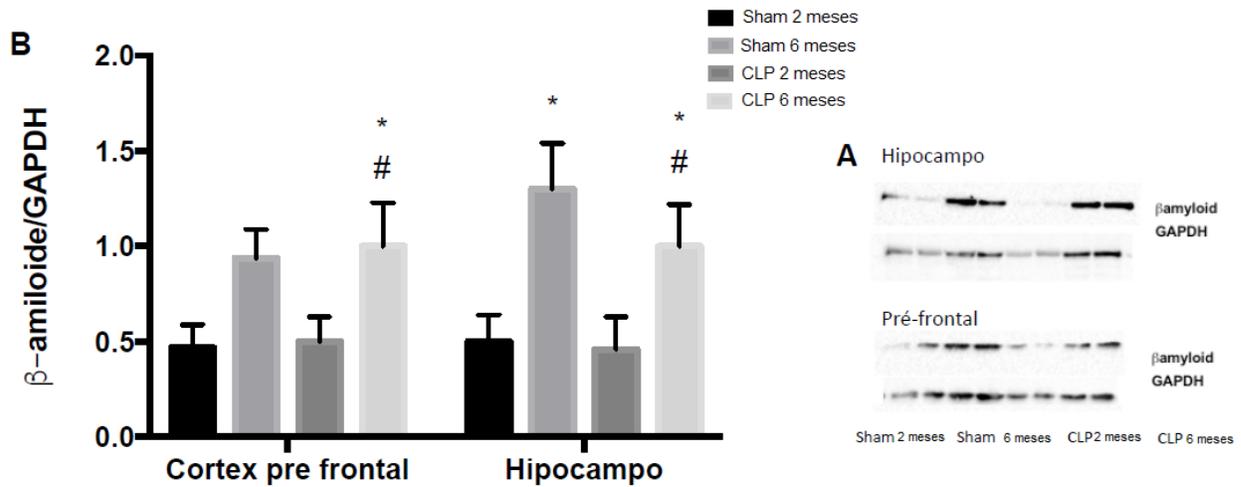


Figura 12. Neuroinflamação pela expressão de β -amilóide no hipocampo e no córtex pré-frontal de animais com 2 e 6 meses de idade submetidos a sepse. Os animais foram submetidos a Sham ou CLP. A expressão de β -amilóide foi realizada por Western blotting. A figura mostra duas bandas representativas para cada grupo (sham com 2 meses, Sham com 6 meses, CLP com 2 meses e CLP com 6 meses). n = 6 *diferente de Sham com 2 meses da idade; #diferente do CLP com 2 meses de idade. ANOVA post hoc Tukey; p <0,05.

Os parâmetros de danos oxidativos foram avaliados usando níveis de proteína carbonílica e equivalentes de MDA (Fig. 13). Os níveis equivalentes de MDA foram aumentados em animais Sham com 6 meses de idade e CLP, mas não em animais com 2 meses de idade (Fig. 13A). No entanto, não houve efeito adicional em animais CLP com 6 meses de idade, uma vez que os níveis equivalentes de MDA não foram significativamente maiores do que nos animais Sham da mesma idade. Os níveis de carbonílica em ratos CLP foram maiores em animais jovens no hipocampo quando comparados com Sham com idade de 2 meses e com animais sépticos com 6 meses (Fig. 13B). Além disso, os níveis de carbonílica foram aumentados no córtex pré-frontal em animais Sham e CLP com 6 meses de idade. Adicionalmente, os níveis de proteína carbonílica foram aumentados no hipocampo dos animais sépticos com 2 e de 6 meses de idade (Fig. 13B).

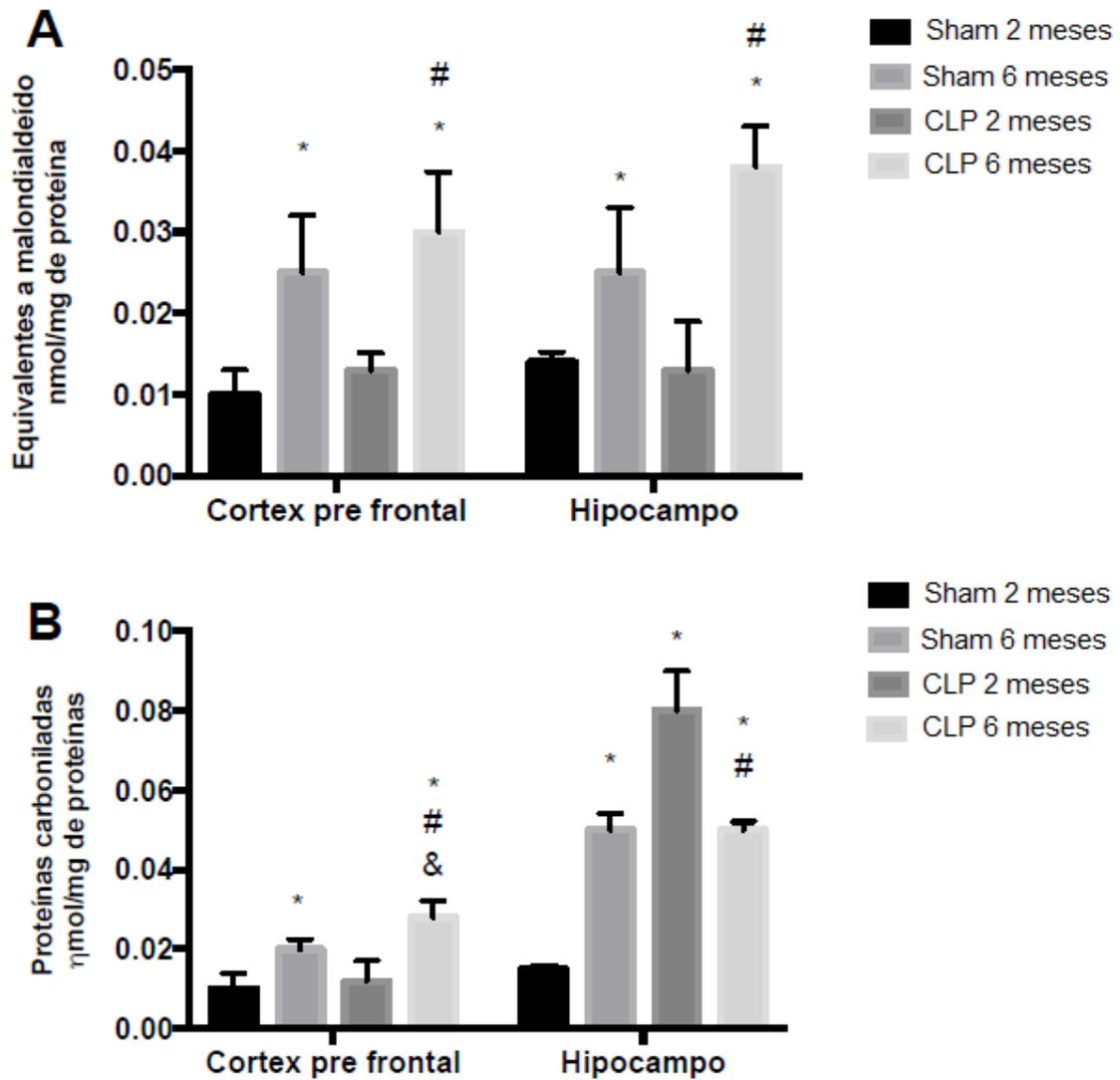


Figura 13. Efeitos da idade no estresse oxidativo após a indução da sepse. A sepse foi induzida por ligadura e perfuração cecal em animais com 2 e 6 meses de idade. Os marcadores de dano oxidativo TBARS (A) e Carbonil (B), foram medidos no córtex pré-frontal e no hipocampo. n = 6 *estatisticamente diferente do Sham com 2 meses de idade; #diferente do CLP com 2 meses de idade; &diferente de Sham com 6 meses de idade. ANOVA *post hoc* Tukey; p <0,05. Os dados foram expressos como média + erro padrão da média.

5 DISCUSSÃO

Este estudo investigou os danos causados pela sepse e pelo envelhecimento a nível de inflamação, comportamento e memória. Para tanto, foram realizadas três etapas distintas ao longo do estudo. As etapas 1 e 2 foram realizadas com animais com 2 meses de idade que foram submetidos a cirurgia para indução de sepse por CLP, e foram submetidos, após 60 ou 90 dias do procedimento, o teste comportamental para avaliar possíveis danos de memória por meio do teste de reconhecimento de objeto novo e, posteriormente a eutanásia, testes bioquímicos foram realizados para avaliar os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, níveis de β A por Western Blot, a atividade de Mieloperoxidase (MPO) e marcadores fenotípicos microgliais (IBA-1, Inos, CD11b, Arg e IL-10) por imunohistoquímica. Na etapa 3, animais com 2 e 6 meses de idade também foram submetidos ao CLP e após 30 dias do procedimento, foram submetidos aos testes comportamentais do nado forçado e esquivas inibitórias e, posteriormente a eutanásia, testes bioquímicos foram realizados para avaliar os níveis das citocinas IL-1 β e IL-6, níveis de β A por Western Blot e parâmetros oxidativo (TBARs e proteína carbonilada).

Foi observado nas etapas 1 e 2 que a inflamação cerebral é persistente até 3 meses após a sepse, e isso está associado a um aumento nos níveis de β A e déficits cognitivos a longo prazo em sobreviventes à sepse. Esses efeitos podem ser exacerbados com o envelhecimento nas citocinas cerebrais e nos níveis de β A. Tem sido demonstrado que os níveis de citocinas, de parâmetros de estresse oxidativo e as alterações no metabolismo energético, observados precocemente após a sepse, podem persistir por dias após o CLP, e isso pode estar associado ao comprometimento cognitivo. Sterket et. al (2013) demonstrou em estudo com ratos *Wistar* induzidos ao modelo de sepse por CLP, que ocorreu um aumento nas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex pré-frontal e uma diminuição no hipocampo, estriado e córtex; uma diminuição da formação da proteína carbonil apenas no córtex pré-frontal e um aumento no estriado. Sessenta dias após a sepse houve uma diminuição nos níveis de TBARS apenas no hipocampo e um aumento da formação da proteína carbonil no estriado (Steckert et al. 2013). Em outro estudo, também com ratos *Wistar* machos, foi demonstrado que ocorreram alterações nos níveis de TBARS no hipocampo durante o início da sepse que persistiu por até 10 dias após a cirurgia. Os níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) diminuíram após 10 dias (Comim et al. 2011).

Um estudo realizado com ratos *Wistar* machos, os animais foram submetidos a seis tarefas comportamentais 10, 30 e 60 dias após a cirurgia: (a) habituação ao campo aberto; (b) tarefa de evitar inibição; (c) tarefa de prevenção inibitória de abaixamento contínuo de múltiplos ensaios; (d) reconhecimento de objetos; (e) labirinto positivo elevado; e (f) teste de natação forçada. Os resultados indicam que o comprometimento da memória e do aprendizado, demonstrado 10 dias após a indução da sepse, persiste 30 dias após o CLP. Os comprometimentos cognitivos não persistiram após 60 dias (Tuon et al. 2008). No entanto, não é bem conhecido se a inflamação do cérebro persiste por mais tempo após a CLP, e se esses efeitos são exacerbados ou não com o envelhecimento. No presente estudo, foi demonstrado que a inflamação do cérebro persiste tardiamente após a indução da sepse e, é em geral, exacerbado com o envelhecimento. Assim, a inflamação sistêmica está emergindo como um fator significativo de declínio cognitivo no cérebro idoso e vulnerável (Michels et al. 2015, Michels et al. 2015). A sepse em si é um fator de risco para demência (Iwashyna et al. 2010). O que sugere que a sepse pode levar o cérebro à inflamação e acelerar o comprometimento neurocognitivo.

Estudos de imagem funcional do cérebro humano, forneceram uma visão sistêmica sem precedentes da atividade neural e como ela muda com o envelhecimento. Esses estudos revelaram que regiões cerebrais distintas que interagem entre si para auxiliar funções cognitivas de ordem superior, apresentam ativação menos coordenada junto ao envelhecimento, sugerindo uma perda global da função integrativa (Andrews-Hanna et al. 2007, Bishop et al. 2010). Além de ser menos integrada, a atividade neural também se torna menos localizada em algumas regiões cerebrais, particularmente no córtex pré-frontal, em resposta a tarefas de nível executivo (Cabeza et al. 2002, Park and Reuter-Lorenz 2009). Em contrapartida, adultos jovens ativam regiões do cérebro mais discretas para realizar as mesmas tarefas e integrar essas regiões mais de perto com outras regiões do cérebro. Vários estudos anteriores, que utilizaram estudo de neuroimagem por meio de tomografia por emissão de pósitrons (PET) para verificar os marcadores β A e tau em humanos (Johnson et al. 2016, Ossenkopppele et al. 2016, Scholl et al. 2016), sugeriram um papel importante desses marcadores nas alterações cerebrais relacionadas ao envelhecimento e na DA pré-clínica (Sepulcre et al. 2016). Um estudo realizado com ratos *Wistar* machos, demonstrou após 30 dias da indução à sepse, avaliou os níveis de β A e de sinaptofisina por análise de Western Blot. O β A aumentou e a sinaptofisina diminuiu em animais sépticos, tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal, concomitantemente à presença de déficits cognitivos (Schwalm et

al. 2014). No presente estudo, foram medidos os níveis de β A e foi observado um aumento significativo no hipocampo e no córtex pré-frontal. Esses dados mostram que a própria sepse é capaz de aumentar os níveis de β A e isso teria impacto na inflamação do cérebro durante o envelhecimento, provavelmente por haver a ativação persistente da micróglia.

A ativação microglial, que desempenha um papel central na neuroinflamação, pode ser regulada por várias interações intercelulares envolvendo moléculas de superfície celular e mediadores solúveis, como as citocinas, as EROs e os neurotransmissores (Gonzalez et al. 2014). A micróglia exibe pelo menos quatro comportamentos funcionais: vigilância, neuroproteção, fagocitose e toxicidade (Chen and Trapp 2016). Além disso, pode ocorrer o *priming* da micróglia e, nesse contexto, em resposta a um estímulo, serão produzidos níveis exacerbados de citocinas inflamatórias (Cunningham et al. 2005). O *priming* torna a micróglia suscetível a um estímulo inflamatório secundário, que pode então desencadear uma resposta inflamatória exacerbada. Esse estímulo pode surgir dentro do SNC, mas em indivíduos idosos, o estímulo secundário mais comumente surge de uma doença sistêmica com um componente inflamatório (Perry and Holmes 2014). Portanto, isso mostra que as alterações imunes centrais e periféricas podem desencadear o *priming* de micróglia que exibe uma resposta inflamatória exagerada em resposta a um insulto imune moderado. É sugerido que a inflamação e o estresse oxidativo aumentem antes do diagnóstico da DA devido à superativação das respostas pró-inflamatórias. Isso reforça a hipótese de que a inflamação cerebral precoce e o estresse oxidativo poderiam estar relacionados à ocorrência de características tardias da neurodegeneração (Fagiolo et al. 1993, Nunomura et al. 2001). Juntos, o aumento sustentado das citocinas inflamatórias e a imunomarcagem pelo IBA-1, dão suporte à visão de que a sepse induz o *priming* da micróglia. Nesse contexto, os dados do presente estudo mostraram que houve um aumento nos marcadores M1 (CD11b, iNOS) e M2 (IL-10 e Arginase). Tang e Le (2016) mostraram que múltiplos fenótipos microgliais coexistem na DA e, provavelmente, estão relacionados no estágio e na gravidade da doença (Tang and Le 2016).

Embora a perda neuronal seja mínima na maioria das regiões corticais do cérebro durante o envelhecimento normal (Yankner et al. 2008), mudanças na fisiologia sináptica dos neurônios em envelhecimento podem contribuir para a alteração de integração e conectividade de ordem superior (Bishop et al. 2010). Em nível histopatológico, a perda neuronal, começando no córtex entorrinal e na região CA1 do hipocampo, juntamente com a perda de volume no lobo

temporal medial, é o que distingue o envelhecimento normal do declínio cognitivo associado à DA (West et al. 1994, Gomez-Isla et al. 1996, Price et al. 2001, Rodrigue and Raz 2004). No entanto, outras marcas fisiopatológicas da DA como a perda de sinapses, a formação de placas β A e os emaranhados neurofibrilares, podem se correlacionar com o declínio cognitivo e se tornarem extensas ao longo do percurso da doença, mas também podem estar presentes, em graus variados, em muitos indivíduos idosos durante a ausência de declínio cognitivo (Cunningham and Hennessy 2015). Os eventos de vida associados ao estresse psicológico e à lesão também podem levar a prejuízos e demência acelerados associados ao envelhecimento (Epel et al. 2004, Smith et al. 2013)

Em relação a memória de reconhecimento de novos objetos, já foi demonstrado, em trabalho já citado anteriormente, que 60 dias após ao CLP os animais apresentavam função cognitiva normal determinada por várias tarefas cognitivas diferentes (Tuon et al. 2008). No presente estudo esse parâmetro se repetiu onde os animais observado após 60 dias não apresentaram dano de memória de reconhecimento, porém, os animais sépticos observados 90 dias após a cirurgia, apresentaram comprometimento de memória, sugerindo que os efeitos perpetuam com o passar do tempo. Portanto, de acordo com os resultados obtidos nas etapas 1 e 2 desse trabalho, postula-se que a sepse poderia ser um estímulo aditivo que poderia acelerar o processo normal de envelhecimento e desencadear mecanismos que poderiam estar associados ao desenvolvimento de demência.

Na etapa 3 do presente estudo, foi demonstrado que tanto a sepse quanto o envelhecimento induziram inflamação cerebral e dano oxidativo e aumentaram o conteúdo de β A em animais com 2 e 6 meses de idade submetidos a sepse e observados 30 dias após a cirurgia. A inflamação sistêmica teve efeitos aditivos no processo fisiológico do envelhecimento com relação a alguns desses parâmetros, reforçando a relevância da idade nas consequências a longo prazo da sepse. O envelhecimento humano é caracterizado por inflamação sistêmica crônica de baixo grau e é um fator de risco altamente significativo para a morbidade e mortalidade entre os idosos (Franceschi et al. 2000). As doenças infecciosas levam ao aumento da mortalidade e da morbidade entre os idosos em comparação com os adultos jovens (High 2004). Recentemente D'avila et al demonstraram que camundongos idosos são suscetíveis à inflamação sistêmica episódica (d'Avila et al. 2018). Estudos prévios mostraram que a inflamação durante a sepse induz disfunção microglial e, conseqüentemente, aumenta os níveis de β A ao ponto de se

tornarem insolúveis e, assim, depositarem-se na forma de placas senis no cérebro (Mestre-Frances et al. 2000, Michels et al. 2015).

Níveis aumentados de placas β A solúveis e difusas também foram observadas em um modelo animal com ratos Sprague Dawley machos que receberam uma única injeção intraperitoneal de 10 mg/kg de endotoxina lipopolissacarídica (LPS) de endotoxemia. A endotoxemia do LPS resultou em elevações de citocinas no sangue e no cérebro. A densidade microglial foi aumentada em ratos tratados com LPS em relação aos controles. O LPS resultou em aumento dos níveis de β A solúvel e de p-tau no cérebro inteiro. Aumentos progressivos nas placas β A morfológicamente difusas ocorreram durante o intervalo de observação (de 7 a 9 dias após o LPS). (Wang et al. 2018). Os efeitos prejudiciais de β A durante a sepse são parcialmente mediados por receptores RAGE (para sinalização de produtos finais de glicação avançada) (Dal-Pizzol et al. 2012, Gasparotto et al. 2018). Adicionalmente, nos modelos CLP e endotoxemia, foram relatados níveis aumentados de p-tau, sugerindo que a formação de placa β A pode resultar em consequências negativas a jusante. (Gasparotto et al. 2018, Wang et al. 2018). No entanto, ao contrário da hipótese original desse estudo, a inflamação sistêmica não aumentou os níveis de β A com o próprio envelhecimento. Um período de acompanhamento mais longo pode ser necessário para observar os efeitos exacerbados da inflamação nos níveis de β A no cérebro. O presente estudo, nas etapas 1 e 2, mostrou que a inflamação cerebral e o aumento dos níveis de β A estavam presentes em animais sépticos por até 30 dias, mas atenuados 60 dias após a indução da sepse, porém, uma segunda onda de inflamação foi observada 90 dias após a indução de sepse. Isso sugere que a neuroinflamação é persistente após a sepse e pode ser mais grave do que a inflamação usual que ocorre durante o envelhecimento cerebral.

O envolvimento do estresse oxidativo e da inflamação no desenvolvimento de encefalopatia associada à sepse e o comprometimento cognitivo a longo prazo, é bem conhecido (Biff et al. 2013). Níveis aumentados de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) diminuíram após 10 dias foram observados nos cérebros de animais sépticos, em estudo já citado (Comim et al. 2011). Em um estudo prospectivo de coorte, realizado em uma unidade de terapia intensiva (UTI) com 20 leitos, incluindo 78 pacientes consecutivos internados por mais de 24 horas (com *delirium* = 31; sem *delirium* = 47), as citocinas plasmáticas mostraram estar associadas tanto à disfunção cerebral aguda (Ritter et al. 2014), quanto a de longo prazo e níveis aumentados de citocina foram relatados nos cérebros de animais sépticos (Comim et al. 2011), e citocinas

plasmáticas mostraram estar associadas tanto a disfunção cerebral aguda (Ritter et al. 2014), quanto a longo prazo em pacientes sépticos (Maciel et al. 2019). Além disso, já foi demonstrado em um estudo realizado com camundongos *Swiss* jovens e idosos que receberam injeções com doses baixas de LPS uma vez por semana durante 6 semanas para induzir inflamação sistêmica episódica, que a inflamação sistêmica episódica induziu comprometimento cognitivo apenas em animais idosos, e isso foi associado a um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) nos camundongos idosos (d'Avila et al. 2018), semelhante ao *priming* de micróglia (Cunningham et al. 2005). Os resultados do presente estudo mostram que os níveis de marcadores de dano inflamatório e oxidativo em ratos com 6 meses de idade foram elevados, como esperado. No entanto, como demonstrado pelos níveis de β A, o efeito da sepse nesses marcadores não foi aditivo. Só foi observado um efeito aditivo da sepse nos níveis de IL-1 β no hipocampo e nos níveis de proteína carbonil no córtex pré-frontal em ratos jovens (2 meses de idade) com CLP. O envelhecimento está associado ao aumento da inflamação cerebral e dano oxidativo devido a diferentes mecanismos, incluindo disfunção da barreira hematoencefálica (Bors et al. 2018) e ao *priming* de micróglia (d'Avila et al. 2018). Esses mecanismos são semelhantes no envelhecimento e na sepse (Cunningham et al. 2005, Dal-Pizzol et al. 2013). Portanto, era esperado que a sepse agravasse o dano cerebral, no entanto, mais estudos são necessários afim de explorar esses mecanismos em animais jovens, adultos e idosos submetidos à sepse para fornecer uma melhor compreensão das diferenças na resposta do cérebro à inflamação sistêmica durante o envelhecimento.

Danos causados ao hipocampo têm sido associados a déficits de memória e aprendizagem em humanos e em modelos animais (Leib et al. 2001, Loeffler et al. 2001). Em um estudo, já citado anteriormente, testes comportamentais mostraram que a memória e o aprendizado foram particularmente prejudicados em camundongos idosos após inflamação sistêmica (d'Avila et al. 2018). Os dados do presente estudo mostram um aumento menor, mas estatisticamente significativo, no tempo de imobilidade durante o teste de nado forçado em ratos CLP (2 e 6 meses de idade) em comparação com ratos Sham (2 e 6 meses de idade). Sepse induz distúrbios comportamentais graves que atingem o pico 30 dias após a indução. Esses distúrbios comportamentais parecem ser apenas marginalmente afetados pela idade. Usando o modelo CLP, já foi demonstrado, anteriormente, que o déficit comportamental melhora gradualmente 60 dias após a indução (Tuon et al. 2008) e, no presente trabalho, foi demonstrado que os animais com 2

meses de idade após 90 dias da indução da sepse apresentam piora nesses parâmetros. Assim, animais com idade de 6 meses podem apresentar déficits comportamentais por um período mais prolongado quando comparados a animais com 2 meses de idade.

Em conjunto, os dados do presente estudo mostram que a idade tem influência na inflamação cerebral e nas alterações comportamentais em ratos séptico e que a sepse foi capaz de promover a neuroinflamação persistente capaz de induzir na micróglia um estado semelhante ao de um primer o que poderia ocasionar um aumento da inflamação usual durante o envelhecimento cerebral.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, a neuroinflamação é persistente após a sepse, sugerindo que a sepse é capaz de induzir na micróglia um estado semelhante ao de um *priming*, e isso poderia aumentar a inflamação usual que ocorre durante o envelhecimento cerebral. A micróglia no envelhecimento, poderia funcionar anormalmente perdendo seus mecanismos quiescentes, tornando-se super-responsivos ao estresse ou estímulos, produzindo moléculas neurotóxicas e pró-inflamatórias. Juntos o envelhecimento e a sepse, podem estar associados ao comprometimento cognitivo de longo prazo, que se assemelha, em alguns aspectos, à demência. Vale a pena notar que essa pequena diferença foi observada após uma comparação entre animais jovens e adultos, e não em animais velhos. Uma hipótese a ser examinada é a de que um efeito mais robusto da sepse pode ser observado em animais mais velhos. Isso deve ser investigado em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- Abraham, E. (2016). "New Definitions for Sepsis and Septic Shock: Continuing Evolution but With Much Still to Be Done." Jama **315**(8): 757-759.
- Andersson, U. and K. J. Tracey (2012). "Reflex principles of immunological homeostasis." Annu Rev Immunol **30**: 313-335.
- Andrades, M., C. Ritter, J. C. Moreira and F. Dal-Pizzol (2005). "Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development." J Surg Res **125**(1): 68-72.
- Andrews-Hanna, J. R., A. Z. Snyder, J. L. Vincent, C. Lustig, D. Head, M. E. Raichle and R. L. Buckner (2007). "Disruption of large-scale brain systems in advanced aging." Neuron **56**(5): 924-935.
- Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo and M. R. Pinsky (2001). "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care." Crit Care Med **29**(7): 1303-1310.
- Angus, D. C. and T. van der Poll (2013). "Severe sepsis and septic shock." N Engl J Med **369**(9): 840-851.
- Bartsch, T. and P. Wulff (2015). "The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability." Neuroscience **309**: 1-16.
- Biber, K., H. Neumann, K. Inoue and H. W. Boddeke (2007). "Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia." Trends Neurosci **30**(11): 596-602.
- Biff, D., F. Petronilho, L. Constantino, F. Vuolo, G. J. Zamora-Berridi, D. M. Dall'Igna, C. M. Comim, J. Quevedo, F. Kapczinski and F. Dal-Pizzol (2013). "Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats." Shock **40**(1): 45-48.
- Bishop, N. A., T. Lu and B. A. Yankner (2010). "Neural mechanisms of ageing and cognitive decline." Nature **464**(7288): 529-535.
- Boekstegers, P., S. Weidenhofer, G. Pilz and K. Werdan (1991). "Peripheral oxygen availability within skeletal muscle in sepsis and septic shock: comparison to limited infection and cardiogenic shock." Infection **19**(5): 317-323.
- Bone, R. C., R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein and W. J. Sibbald (1992). "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." Chest **101**(6): 1644-1655.

- Bors, L., K. Toth, E. Z. Toth, A. Bajza, A. Csorba, K. Szigeti, D. Mathe, G. Perlaki, G. Orsi, G. K. Toth and F. Erdo (2018). "Age-dependent changes at the blood-brain barrier. A Comparative structural and functional study in young adult and middle aged rats." Brain Res Bull **139**: 269-277.
- Brealey, D., M. Brand, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, R. Smolenski, N. A. Davies, C. E. Cooper and M. Singer (2002). "Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock." Lancet **360**(9328): 219-223.
- Buoso, E., C. Lanni, G. Schettini, S. Govoni and M. Racchi (2010). "beta-Amyloid precursor protein metabolism: focus on the functions and degradation of its intracellular domain." Pharmacol Res **62**(4): 308-317.
- Cabeza, R., N. D. Anderson, J. K. Locantore and A. R. McIntosh (2002). "Aging gracefully: compensatory brain activity in high-performing older adults." Neuroimage **17**(3): 1394-1402.
- Carre, J. E., J. C. Orban, L. Re, K. Felsmann, W. Iffert, M. Bauer, H. B. Suliman, C. A. Piantadosi, T. M. Mayhew, P. Breen, M. Stotz and M. Singer (2010). "Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis." Am J Respir Crit Care Med **182**(6): 745-751.
- Cesari, M., B. Vellas and G. Gambassi (2013). "The stress of aging." Experimental Gerontology **48**(4): 451-456.
- Chen, Z. and B. D. Trapp (2016). "Microglia and neuroprotection." J Neurochem **136 Suppl 1**: 10-17.
- Combrinck, M. I., V. H. Perry and C. Cunningham (2002). "Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease." Neuroscience **112**(1): 7-11.
- Comim, C. M., O. J. Cassol, Jr., L. S. Constantino, F. Felisberto, F. Petronilho, G. T. Rezin, G. Scaini, J. F. Daufenbach, E. L. Streck, J. Quevedo and F. Dal-Pizzol (2011). "Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats." Neurochem Res **36**(2): 304-311.
- Crouser, E. D. (2004). "Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome." Mitochondrion **4**(5-6): 729-741.
- Cunningham, C., S. Champion, K. Lunnon, C. L. Murray, J. F. Woods, R. M. Deacon, J. N. Rawlins and V. H. Perry (2009). "Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease." Biol Psychiatry **65**(4): 304-312.
- Cunningham, C. and E. Hennessy (2015). "Co-morbidity and systemic inflammation as drivers of cognitive decline: new experimental models adopting a broader paradigm in dementia research." Alzheimers Res Ther **7**(1): 33.

Cunningham, C., D. C. Wilcockson, S. Champion, K. Lunnon and V. H. Perry (2005). "Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration." J Neurosci **25**(40): 9275-9284.

d'Avila, J. C., L. D. Siqueira, A. Mazeraud, E. P. Azevedo, D. Foguel, H. C. Castro-Faria-Neto, T. Sharshar, F. Chretien and F. A. Bozza (2018). "Age-related cognitive impairment is associated with long-term neuroinflammation and oxidative stress in a mouse model of episodic systemic inflammation." J Neuroinflammation **15**(1): 28.

Dal-Pizzol, F., M. Pasquali, J. Quevedo, D. P. Gelain and J. C. Moreira (2012). "Is there a role for high mobility group box 1 and the receptor for advanced glycation end products in the genesis of long-term cognitive impairment in sepsis survivors?" Mol Med **18**: 1357-1358; author reply 1359.

Dal-Pizzol, F., H. A. Rojas, E. M. dos Santos, F. Vuolo, L. Constantino, G. Feier, M. Pasquali, C. M. Comim, F. Petronilho, D. P. Gelain, J. Quevedo, J. C. Moreira and C. Ritter (2013). "Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis." Mol Neurobiol **48**(1): 62-70.

Dantzer, R., J. C. O'Connor, G. G. Freund, R. W. Johnson and K. W. Kelley (2008). "From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain." Nat Rev Neurosci **9**(1): 46-56.

Davinelli, S., M. Maes, G. Corbi, A. Zarrelli, D. C. Willcox and G. Scapagnini (2016). "Dietary phytochemicals and neuro-inflammaging: from mechanistic insights to translational challenges." Immun Ageing **13**: 16.

De Young, L. M., J. B. Kheifets, S. J. Ballaron and J. M. Young (1989). "Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents." Agents Actions **26**(3-4): 335-341.

Del Rio, D., A. J. Stewart and N. Pellegrini (2005). "A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress." Nutr Metab Cardiovasc Dis **15**(4): 316-328.

Draper, H. H. and M. Hadley (1990). "Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation." Methods Enzymol **186**: 421-431.

Droge, W. (2002). "Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants." Exp Gerontol **37**(12): 1333-1345.

Dubois, M. J., N. Bergeron, M. Dumont, S. Dial and Y. Skrobik (2001). "Delirium in an intensive care unit: a study of risk factors." Intensive Care Med **27**(8): 1297-1304.

Ely, E. W., A. Shintani, B. Truman, T. Speroff, S. M. Gordon, F. E. Harrell, Jr., S. K. Inouye, G. R. Bernard and R. S. Dittus (2004). "Delirium as a predictor of mortality in mechanically ventilated patients in the intensive care unit." Jama **291**(14): 1753-1762.

Epel, E. S., E. H. Blackburn, J. Lin, F. S. Dhabhar, N. E. Adler, J. D. Morrow and R. M. Cawthon (2004). "Accelerated telomere shortening in response to life stress." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17312-17315.

Esiri, M. M. (2007). "Ageing and the brain." J Pathol **211**(2): 181-187.

Fagiolo, U., A. Cossarizza, E. Scala, E. Fanales-Belasio, C. Ortolani, E. Cozzi, D. Monti, C. Franceschi and R. Paganelli (1993). "Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people." Eur J Immunol **23**(9): 2375-2378.

Field, R., S. Champion, C. Warren, C. Murray and C. Cunningham (2010). "Systemic challenge with the TLR3 agonist poly I:C induces amplified IFN α /beta and IL-1beta responses in the diseased brain and exacerbates chronic neurodegeneration." Brain Behav Immun **24**(6): 996-1007.

Fink, M. P. (2001). "Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis." Crit Care Clin **17**(1): 219-237.

Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**(6809): 239-247.

Fischer, R. and O. Maier (2015). "Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF." Oxid Med Cell Longev **2015**: 610813.

Franceschi, C., M. Bonafe, S. Valensin, F. Olivieri, M. De Luca, E. Ottaviani and G. De Benedictis (2000). "Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence." Ann N Y Acad Sci **908**: 244-254.

Frevert, C. W. and T. R. Martin (2004). "Sepsis and the lung host response." Semin Respir Crit Care Med **25**(1): 85-93.

Gabrysova, L., A. Howes, M. Saraiva and A. O'Garra (2014). "The regulation of IL-10 expression." Curr Top Microbiol Immunol **380**: 157-190.

Gasparotto, J., C. S. Girardi, N. Somensi, C. T. Ribeiro, J. C. F. Moreira, M. Michels, B. Sonai, M. Rocha, A. V. Steckert, T. Barichello, J. Quevedo, F. Dal-Pizzol and D. P. Gelain (2018). "Receptor for advanced glycation end products mediates sepsis-triggered amyloid-beta accumulation, Tau phosphorylation, and cognitive impairment." J Biol Chem **293**(1): 226-244.

Gibson, K. L., Y. C. Wu, Y. Barnett, O. Duggan, R. Vaughan, E. Kondeatis, B. O. Nilsson, A. Wikby, D. Kipling and D. K. Dunn-Walters (2009). "B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status." Aging Cell **8**(1): 18-25.

- Girard, T. D., J. C. Jackson, P. P. Pandharipande, B. T. Pun, J. L. Thompson, A. K. Shintani, S. M. Gordon, A. E. Canonico, R. S. Dittus, G. R. Bernard and E. W. Ely (2010). "Delirium as a predictor of long-term cognitive impairment in survivors of critical illness." Crit Care Med **38**(7): 1513-1520.
- Giulian, D., T. J. Baker, L. C. Shih and L. B. Lachman (1986). "Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia." J Exp Med **164**(2): 594-604.
- Gomez-Isla, T., J. L. Price, D. W. McKeel, Jr., J. C. Morris, J. H. Growdon and B. T. Hyman (1996). "Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease." J Neurosci **16**(14): 4491-4500.
- Gonzalez, H., D. Elgueta, A. Montoya and R. Pacheco (2014). "Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases." J Neuroimmunol **274**(1-2): 1-13.
- Grimm, S., A. Hoehn, K. J. Davies and T. Grune (2011). "Protein oxidative modifications in the ageing brain: consequence for the onset of neurodegenerative disease." Free Radic Res **45**(1): 73-88.
- Grubeck-Loebenstien, B., S. Della Bella, A. M. Iorio, J. P. Michel, G. Pawelec and R. Solana (2009). "Immunosenescence and vaccine failure in the elderly." Aging Clin Exp Res **21**(3): 201-209.
- Guest, J., R. Grant, T. A. Mori and K. D. Croft (2014). "Changes in oxidative damage, inflammation and [NAD(H)] with age in cerebrospinal fluid." PLoS One **9**(1): e85335.
- Gutteridge, J. M. C. and B. Halliwell (2018). "Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success?" Biochem Biophys Res Commun **502**(2): 183-186.
- Haapasalo, A., J. Viswanathan, L. Bertram, H. Soininen, R. E. Tanzi and M. Hiltunen (2010). "Emerging role of Alzheimer's disease-associated ubiquitin-1 in protein aggregation." Biochem Soc Trans **38**(Pt 1): 150-155.
- Halliwell, B. (2006). "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life." Plant Physiol **141**(2): 312-322.
- Hanisch, U. K. and H. Kettenmann (2007). "Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain." Nat Neurosci **10**(11): 1387-1394.
- Hayflick, L. (2007). "Biological aging is no longer an unsolved problem." Ann N Y Acad Sci **1100**: 1-13.
- Heppner, F. L., R. M. Ransohoff and B. Becher (2015). "Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease." Nat Rev Neurosci **16**(6): 358-372.

High, K. P. (2004). "Infection as a cause of age-related morbidity and mortality." Ageing Res Rev **3**(1): 1-14.

Howard, R., R. McShane, J. Lindesay, C. Ritchie, A. Baldwin, R. Barber, A. Burns, T. Denning, D. Findlay, C. Holmes, R. Jones, R. Jones, I. McKeith, A. Macharouthu, J. O'Brien, B. Sheehan, E. Juszczak, C. Katona, R. Hills, M. Knapp, C. Ballard, R. G. Brown, S. Banerjee, J. Adams, T. Johnson, P. Bentham and P. P. Phillips (2015). "Nursing home placement in the Donepezil and Memantine in Moderate to Severe Alzheimer's Disease (DOMINO-AD) trial: secondary and post-hoc analyses." Lancet Neurol **14**(12): 1171-1181.

Hsieh, H. L. and C. M. Yang (2013). "Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases." Biomed Res Int **2013**: 484613.

Ismail, Z., M. Q. Nguyen, C. E. Fischer, T. A. Schweizer, B. H. Mulsant and D. Mamo (2011). "Neurobiology of delusions in Alzheimer's disease." Curr Psychiatry Rep **13**(3): 211-218.

Iwashyna, T. J., E. W. Ely, D. M. Smith and K. M. Langa (2010). "Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis." Jama **304**(16): 1787-1794.

Izquierdo, I., D. M. Barros, T. Mello e Souza, M. M. de Souza, L. A. Izquierdo and J. H. Medina (1998). "Mechanisms for memory types differ." Nature **393**(6686): 635-636.

Johnson, K. A., A. Schultz, R. A. Betensky, J. A. Becker, J. Sepulcre, D. Rentz, E. Mormino, J. Chhatwal, R. Amariglio, K. Papp, G. Marshall, M. Albers, S. Mauro, L. Pepin, J. Alverio, K.

Judge, M. Philiossaint, T. Shoup, D. Yokell, B. Dickerson, T. Gomez-Isla, B. Hyman, N. Vasdev and R. Sperling (2016). "Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease." Ann Neurol **79**(1): 110-119.

Karlsson, S., E. Ruokonen, T. Varpula, T. I. Ala-Kokko and V. Pettila (2009). "Long-term outcome and quality-adjusted life years after severe sepsis." Crit Care Med **37**(4): 1268-1274.

Kozlov, A. V., S. Bahrami, E. Calzia, P. Dungel, L. Gille, A. V. Kuznetsov and J. Troppmair (2011). "Mitochondrial dysfunction and biogenesis: do ICU patients die from mitochondrial failure?" Ann Intensive Care **1**(1): 41.

Kumar, A., V. Thota, L. Dee, J. Olson, E. Uretz and J. E. Parrillo (1996). "Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum." J Exp Med **183**(3): 949-958.

Lasagna-Reeves, C. A., C. G. Glabe and R. Kaye (2011). "Amyloid- β Annular Protofibrils Evade Fibrillar Fate in Alzheimer Disease Brain." The Journal of Biological Chemistry **286**(25): 22122-22130.

Lee, H., C. J. Doig, W. A. Ghali, C. Donaldson, D. Johnson and B. Manns (2004). "Detailed cost analysis of care for survivors of severe sepsis." Crit Care Med **32**(4): 981-985.

Leib, S. L., J. M. Clements, R. L. Lindberg, C. Heimgartner, J. M. Loeffler, L. A. Pfister, M. G. Tauber and D. Leppert (2001). "Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis." Brain **124**(Pt 9): 1734-1742.

Lemstra, A. W., J. C. Groen in't Woud, J. J. Hoozemans, E. S. van Haastert, A. J. Rozemuller, P. Eikelenboom and W. A. van Gool (2007). "Microglia activation in sepsis: a case-control study." J Neuroinflammation **4**: 4.

Leng, S., Q. L. Xue, Y. Huang, R. Semba, P. Chaves, K. Bandeen-Roche, L. Fried and J. Walston (2005). "Total and differential white blood cell counts and their associations with circulating interleukin-6 levels in community-dwelling older women." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **60**(2): 195-199.

Lever, A. and I. Mackenzie (2007). "Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis." Bmj **335**(7625): 879-883.

Levine, R. L., D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. G. Lenz, B. W. Ahn, S. Shaltiel and E. R. Stadtman (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins." Methods Enzymol **186**: 464-478.

Levy, M. M., M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent and G. Ramsay (2003). "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference." Crit Care Med **31**(4): 1250-1256.

Lichtenberg, D. and I. Pinchuk (2015). "Oxidative stress, the term and the concept." Biochem Biophys Res Commun **461**(3): 441-444.

Loeffler, J. M., R. Ringer, M. Hablutzel, M. G. Tauber and S. L. Leib (2001). "The free radical scavenger alpha-phenyl-tert-butyl nitron aggravates hippocampal apoptosis and learning deficits in experimental pneumococcal meningitis." J Infect Dis **183**(2): 247-252.

Lou, N., T. Takano, Y. Pei, A. L. Xavier, S. A. Goldman and M. Nedergaard (2016). "Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood-brain barrier." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(4): 1074-1079.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.

Machado, F. R., A. B. Cavalcanti, F. A. Bozza, E. M. Ferreira, F. S. Angotti Carrara, J. L. Sousa, N. Caixeta, R. Salomao, D. C. Angus and L. C. Pontes Azevedo (2017). "The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study." Lancet Infect Dis **17**(11): 1180-1189.

Maciel, M., S. R. Benedet, E. B. Lunardelli, H. Delziovio, R. L. Domingues, F. Vuolo, C. D. Tomasi, R. Walz, C. Ritter and F. Dal-Pizzol (2019). "Predicting Long-term Cognitive Dysfunction in Survivors of Critical Illness with Plasma Inflammatory Markers: a Retrospective Cohort Study." *56*(1): 763-767.

Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton and M. Moss (2003). "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000." *N Engl J Med* **348**(16): 1546-1554.

Mestre-Frances, N., E. Keller, A. Calenda, H. Barelli, F. Checler and N. Bons (2000). "Immunohistochemical analysis of cerebral cortical and vascular lesions in the primate *Microcebus murinus* reveal distinct amyloid beta1-42 and beta1-40 immunoreactivity profiles." *Neurobiol Dis* **7**(1): 1-8.

Michels, M., L. G. Danielski, F. Dal-Pizzol and F. Petronilho (2014). "Neuroinflammation: microglial activation during sepsis." *Curr Neurovasc Res* **11**(3): 262-270.

Michels, M., A. V. Steckert, J. Quevedo, T. Barichello and F. Dal-Pizzol (2015). "Mechanisms of long-term cognitive dysfunction of sepsis: from blood-borne leukocytes to glial cells." *Intensive Care Med Exp* **3**(1): 30.

Michels, M., A. S. Vieira, F. Vuolo, H. G. Zapelini, B. Mendonca, F. Mina, D. Dominguni, A. Steckert, P. F. Schuck, J. Quevedo, F. Petronilho and F. Dal-Pizzol (2015). "The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment." *Brain Behav Immun* **43**: 54-59.

Moehle, M. S. and A. B. West (2015). "M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally?" *Neuroscience* **302**: 59-73.

Morcillo, E. J., J. Estrela and J. Cortijo (1999). "Oxidative stress and pulmonary inflammation: pharmacological intervention with antioxidants." *Pharmacol Res* **40**(5): 393-404.

Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochem J* **417**(1): 1-13.

Murray, C. A. and M. A. Lynch (1998). "Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation." *J Neurosci* **18**(8): 2974-2981.

Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff and F. Helmchen (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." *Science* **308**(5726): 1314-1318.

Niraula, A. and J. F. Sheridan (2017). "Microglia Priming with Aging and Stress." **42**(1): 318-333.

Nunomura, A., G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda, E. K. Balraj, P. K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya, S. Shimohama, S. Chiba, C. S. Atwood, R. B. Petersen and M. A. Smith (2001).

"Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **60**(8): 759-767.

Okuyama, T., R. Nakatake, M. Kaibori, T. Okumura, M. Kon and M. Nishizawa (2018). "A sense oligonucleotide to inducible nitric oxide synthase mRNA increases the survival rate of rats in septic shock." Nitric Oxide **72**: 32-40.

Ortmann, C. F., G. Z. Reus, Z. M. Ignacio, H. M. Abelaira, S. E. Titus, P. de Carvalho, C. O. Arent, M. A. Dos Santos, B. I. Matias, M. M. Martins, A. M. de Campos, F. Petronilho, L. J. Teixeira, M. O. Morais, E. L. Streck, J. Quevedo and F. H. Reginatto (2016). "Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trecul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress." Neurotox Res **29**(4): 469-483.

Ossenkoppele, R., D. R. Schonhaut, M. Scholl, S. N. Lockhart, N. Ayakta, S. L. Baker, J. P. O'Neil, M. Janabi, A. Lazaris, A. Cantwell, J. Vogel, M. Santos, Z. A. Miller, B. M. Bettcher, K. A. Vossel, J. H. Kramer, M. L. Gorno-Tempini, B. L. Miller, W. J. Jagust and G. D. Rabinovici (2016). "Tau PET patterns mirror clinical and neuroanatomical variability in Alzheimer's disease." Brain **139**(Pt 5): 1551-1567.

Pandharipande, P., A. Shintani, J. Peterson, B. T. Pun, G. R. Wilkinson, R. S. Dittus, G. R. Bernard and E. W. Ely (2006). "Lorazepam is an independent risk factor for transitioning to delirium in intensive care unit patients." Anesthesiology **104**(1): 21-26.

Pandharipande, P. P., T. D. Girard and E. W. Ely (2014). "Long-term cognitive impairment after critical illness." N Engl J Med **370**(2): 185-186.

Pandharipande, P. P., T. D. Girard, J. C. Jackson, A. Morandi, J. L. Thompson, B. T. Pun, N. E. Brummel, C. G. Hughes, E. E. Vasilevskis, A. K. Shintani, K. G. Moons, S. K. Geevarghese, A. Canonico, R. O. Hopkins, G. R. Bernard, R. S. Dittus and E. W. Ely (2013). "Long-term cognitive impairment after critical illness." N Engl J Med **369**(14): 1306-1316.

Pandharipande, P. P., M. B. Patel and J. Barr (2014). "Management of pain, agitation, and delirium in critically ill patients." Pol Arch Med Wewn **124**(3): 114-123.

Paolicelli, R. C., G. Bolasco, F. Pagani, L. Maggi, M. Scianni, P. Panzanelli, M. Giustetto, T. A. Ferreira, E. Guiducci, L. Dumas, D. Ragozzino and C. T. Gross (2011). "Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development." Science **333**(6048): 1456-1458.

Paouri, E. and S. Georgopoulos (2019). "Systemic and CNS Inflammation Crosstalk: Implications for Alzheimer's Disease." Curr Alzheimer Res **16**(6): 559-574.

Parihar, A., M. S. Parihar, S. Milner and S. Bhat (2008). "Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury." Burns **34**(1): 6-17.

- Park, D. C. and P. Reuter-Lorenz (2009). "The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding." Annu Rev Psychol **60**: 173-196.
- Perry, V. H. (2004). "The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease." Brain Behav Immun **18**(5): 407-413.
- Perry, V. H. and C. Holmes (2014). "Microglial priming in neurodegenerative disease." Nat Rev Neurol **10**(4): 217-224.
- Pierce, A. L., S. S. Bullain and C. H. Kawas (2017). "Late-Onset Alzheimer Disease." Neurol Clin **35**(2): 283-293.
- Pisani, M. A., S. Y. Kong, S. V. Kasl, T. E. Murphy, K. L. Araujo and P. H. Van Ness (2009). "Days of delirium are associated with 1-year mortality in an older intensive care unit population." Am J Respir Crit Care Med **180**(11): 1092-1097.
- Porsolt, R. D., A. Bertin and M. Jalfre (1977). "Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants." Arch Int Pharmacodyn Ther **229**(2): 327-336.
- Price, J. L., A. I. Ko, M. J. Wade, S. K. Tsou, D. W. McKeel and J. C. Morris (2001). "Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease." Arch Neurol **58**(9): 1395-1402.
- Primiani, C. T., V. H. Ryan, J. S. Rao, M. C. Cam, K. Ahn, H. R. Modi and S. I. Rapoport (2014). "Coordinated gene expression of neuroinflammatory and cell signaling markers in dorsolateral prefrontal cortex during human brain development and aging." PLoS One **9**(10): e110972.
- Prischmann, J. (2016). "Life and death in Alzheimer's disease." Minn Med **99**(1): 20-21.
- Puzzo, D., W. Gulisano, O. Arancio and A. Palmeri (2015). "The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in Abeta physiology." Neuroscience **307**: 26-36.
- Rannikko, J., J. Syrjanen, T. Seiskari, J. Aittoniemi and R. Huttunen (2017). "Sepsis-related mortality in 497 cases with blood culture-positive sepsis in an emergency department." Int J Infect Dis **58**: 52-57.
- Ransohoff, R. M. (2016). "How neuroinflammation contributes to neurodegeneration." Science **353**(6301): 777-783.
- Ritter, C., C. D. Tomasi, F. Dal-Pizzol, B. B. Pinto, A. Dyson, A. S. de Miranda, C. M. Comim, M. Soares, A. L. Teixeira, J. Quevedo and M. Singer (2014). "Inflammation biomarkers and delirium in critically ill patients." Crit Care **18**(3): R106.

Rivers, E. P. and T. Ahrens (2008). "Improving outcomes for severe sepsis and septic shock: tools for early identification of at-risk patients and treatment protocol implementation." Crit Care Clin **24**(3 Suppl): S1-47.

Rodrigue, K. M. and N. Raz (2004). "Shrinkage of the entorhinal cortex over five years predicts memory performance in healthy adults." J Neurosci **24**(4): 956-963.

Roesler, R., M. R. Vianna, F. de-Paris and J. Quevedo (1999). "Memory-enhancing treatments do not reverse the impairment of inhibitory avoidance retention induced by NMDA receptor blockade." Neurobiol Learn Mem **72**(3): 252-258.

Rosa, R. M., D. G. Flores, H. R. Appelt, A. L. Braga, J. A. Henriques and R. Roesler (2003). "Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice." Neurosci Lett **341**(3): 217-220.

Roubenoff, R., T. B. Harris, L. W. Abad, P. W. Wilson, G. E. Dallal and C. A. Dinarello (1998). "Monocyte cytokine production in an elderly population: effect of age and inflammation." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **53**(1): M20-26.

Sair, M., P. J. Etherington, C. Peter Winlove and T. W. Evans (2001). "Tissue oxygenation and perfusion in patients with systemic sepsis." Crit Care Med **29**(7): 1343-1349.

Schafer, D. P., E. K. Lehrman, A. G. Kautzman, R. Koyama, A. R. Mardinly, R. Yamasaki, R. M. Ransohoff, M. E. Greenberg, B. A. Barres and B. Stevens (2012). "Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner." Neuron **74**(4): 691-705.

Scholl, M., S. N. Lockhart, D. R. Schonhaut, J. P. O'Neil, M. Janabi, R. Ossenkoppele, S. L. Baker, J. W. Vogel, J. Faria, H. D. Schwimmer, G. D. Rabinovici and W. J. Jagust (2016). "PET Imaging of Tau Deposition in the Aging Human Brain." Neuron **89**(5): 971-982.

Schwalm, M. T., M. Pasquali, S. P. Miguel, J. P. Dos Santos, F. Vuolo, C. M. Comim, F. Petronilho, J. Quevedo, D. P. Gelain, J. C. Moreira, C. Ritter and F. Dal-Pizzol (2014). "Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats." Mol Neurobiol **49**(1): 380-385.

Seals, D. R. and S. Melov (2014). "Translational geroscience: emphasizing function to achieve optimal longevity." Aging (Albany NY) **6**(9): 718-730.

Sepulcre, J., A. P. Schultz, M. Sabuncu, T. Gomez-Isla and J. Chhatwal (2016). "In Vivo Tau, Amyloid, and Gray Matter Profiles in the Aging Brain." **36**(28): 7364-7374.

Sies, H. (2015). "Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine." Redox Biol **4**: 180-183.

Sies, H., C. Berndt and D. P. Jones (2017). "Oxidative Stress." Annu Rev Biochem **86**: 715-748.

Silva, E., A. Pedro Mde, A. C. Sogayar, T. Mohovic, C. L. Silva, M. Janiszewski, R. G. Cal, E. F. de Sousa, T. P. Abe, J. de Andrade, J. D. de Matos, E. Rezende, M. Assuncao, A. Avezum, P. C. Rocha, G. F. de Matos, A. M. Bento, A. D. Correa, P. C. Vieira and E. Knobel (2004). "Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study)." Crit Care **8**(4): R251-260.

Singer, M. (2014). "The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure." Virulence **5**(1): 66-72.

Singer, M., C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J. D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J. L. Vincent and D. C. Angus (2016). "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)." Jama **315**(8): 801-810.

Sjakste, N., L. Baumann, J. L. Boucher, M. Dzintare, D. Meirena, J. Sjakste, L. Lauberte and I. Kalvinsh (2004). "Effects of gamma-butyrobetaine and mildronate on nitric oxide production in lipopolysaccharide-treated rats." Basic Clin Pharmacol Toxicol **94**(1): 46-50.

Smith, D. H., V. E. Johnson and W. Stewart (2013). "Chronic neuropathologies of single and repetitive TBI: substrates of dementia?" Nat Rev Neurol **9**(4): 211-221.

Steckert, A. V., C. M. Comim, F. Mina, B. P. Mendonca, D. Dominguni, G. K. Ferreira, M. Carvalho-Silva, J. S. Vieira, E. L. Streck, J. Quevedo and F. Dal-Pizzol (2013). "Late brain alterations in sepsis-survivor rats." Synapse **67**(11): 786-793.

Svistunenko, D. A., N. Davies, D. Brealey, M. Singer and C. E. Cooper (2006). "Mitochondrial dysfunction in patients with severe sepsis: an EPR interrogation of individual respiratory chain components." Biochim Biophys Acta **1757**(4): 262-272.

Tan, J. M., E. S. Wong and K. L. Lim (2009). "Protein misfolding and aggregation in Parkinson's disease." Antioxid Redox Signal **11**(9): 2119-2134.

Tan, Z. S., A. S. Beiser, R. S. Vasan, R. Roubenoff, C. A. Dinarello, T. B. Harris, E. J. Benjamin, R. Au, D. P. Kiel, P. A. Wolf and S. Seshadri (2007). "Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study." Neurology **68**(22): 1902-1908.

Tang, Y. and W. Le (2016). "Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases." Mol Neurobiol **53**(2): 1181-1194.

Tang, Y. and W. Le (2016). "Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases." Mol Neurobiol **53**(2): 1181-1194.

Tansey, M. G., M. K. McCoy and T. C. Frank-Cannon (2007). "Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention." Exp Neurol **208**(1): 1-25.

Taylor, J. M., B. S. Main and P. J. Crack (2013). "Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease." Neurochem Int **62**(5): 803-819.

Teeling, J. L. and V. H. Perry (2009). "Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms." Neuroscience **158**(3): 1062-1073.

Torio, C. M. and R. M. Andrews (2006). National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011: Statistical Brief #160. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs. Rockville (MD), Agency for Healthcare Research and Quality (US).

Tremblay, M. E., R. L. Lowery and A. K. Majewska (2010). "Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience." PLoS Biol **8**(11): e1000527.

Tretter, L. and V. Adam-Vizi (2005). "Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **360**(1464): 2335-2345.

Tuon, L., C. M. Comim, F. Petronilho, T. Barichello, I. Izquierdo, J. Quevedo and F. Dal-Pizzol (2008). "Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats." Intensive Care Med **34**(9): 1724-1731.

Vickers, J. C., S. Mitew, A. Woodhouse, C. M. Fernandez-Martos, M. T. Kirkcaldie, A. J. Canty, G. H. McCormack and A. E. King (2016). "Defining the earliest pathological changes of Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **13**(3): 281-287.

Villeda, S. A., J. Luo, K. I. Mosher, B. Zou, M. Britschgi, G. Bieri, T. M. Stan, N. Fainberg, Z. Ding, A. Eggel, K. M. Lucin, E. Czirr, J. S. Park, S. Couillard-Despres, L. Aigner, G. Li, E. R. Peskind, J. A. Kaye, J. F. Quinn, D. R. Galasko, X. S. Xie, T. A. Rando and T. Wyss-Coray (2011). "The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function." Nature **477**(7362): 90-94.

Vincent, J. L., S. M. Opal, J. C. Marshall and K. J. Tracey (2013). "Sepsis definitions: time for change." Lancet **381**(9868): 774-775.

Wang, L. M., Q. Wu, R. A. Kirk, K. P. Horn, A. H. Ebada Salem, J. M. Hoffman, J. T. Yap, J. A. Sonnen, R. A. Towner, F. A. Bozza, R. S. Rodrigues and K. A. Morton (2018). "Lipopolysaccharide endotoxemia induces amyloid-beta and p-tau formation in the rat brain." Am J Nucl Med Mol Imaging **8**(2): 86-99.

West, M. J., P. D. Coleman, D. G. Flood and J. C. Troncoso (1994). "Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease." Lancet **344**(8925): 769-772.

Weycker, D., K. S. Akhras, J. Edelsberg, D. C. Angus and G. Oster (2003). "Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis." Crit Care Med **31**(9): 2316-2323.

Widmann, C. N. and M. T. Heneka (2014). "Long-term cerebral consequences of sepsis." Lancet Neurol **13**(6): 630-636.

Winters, B. D., M. Eberlein, J. Leung, D. M. Needham, P. J. Pronovost and J. E. Sevransky (2010). "Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review." Crit Care Med **38**(5): 1276-1283.

Yankner, B. A., T. Lu and P. Loerch (2008). "The aging brain." Annu Rev Pathol **3**: 41-66.

Yu, Y. and R. D. Ye (2015). "Microglial Abeta receptors in Alzheimer's disease." Cell Mol Neurobiol **35**(1): 71-83.

Zlatar, Z. Z., A. Bischoff-Grethe, C. C. Hays, T. T. Liu, M. J. Meloy, R. A. Rissman, M. W. Bondi and C. E. Wierenga (2016). "Higher Brain Perfusion May Not Support Memory Functions in Cognitively Normal Carriers of the ApoE epsilon4 Allele Compared to Non-Carriers." Front Aging Neurosci **8**: 151.

ANEXO

ANEXO 1 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICO NO USO DE ANIMAIS



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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de parâmetros comportamentais e neuroquímicos em ratos velhos submetidos a sepse.", registrada com o protocolo nº 077/2016-1, sob a responsabilidade de Felipe Dal Pizzol, junto à equipe: Monique Michels, Pricila Ávila, Amanda Valnier Steckert, Diogo Domingui, Bruna Pescador Mendonça, João Luciano de Quevedo - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 26/07/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	08/2016 a 08/2017.
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	250 - 350 g e 450 - 550 g 2 meses e 14 meses
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "Evaluation of behavioral and neurochemical parameters in old rats with sepsis".

Protocol number: 077/2016-1

Principal Investigator: Felipe Dal Pizzol

Researchers: Monique Michels, Pricila Ávila, Amanda Valnier Steckert, Diogo Domingui, Bruna Pescador Mendonça, João Luciano de Quevedo.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 26 de julho de 2016.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA