

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Disfunção cerebral associada à sepse: papel das estatinas na prevenção do dano cognitivo em modelo de sepse experimental

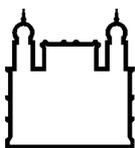
Pedro Celso Braga Alexandre

Orientador (es): Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto
Dr. Fernando Augusto Bozza

Co-orientadora: Dr^a. Patrícia Alves Reis

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Pedro Celso Braga Alexandre

Disfunção cerebral associada à sepse: papel das estatinas na prevenção do dano cognitivo em modelo de sepse experimental

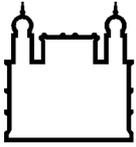
Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto
Dr. Fernando Augusto Bozza

Co-orientadora: Dr^a. Patrícia Alves Reis

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR : Pedro Celso Braga Alexandre

Disfunção cerebral associada à sepse: papel das estatinas na prevenção do dano cognitivo em modelo de sepse experimental

Orientador (es): Dr. Hugo Caire de Castro Faria neto
Dr. Fernando Augusto Bozza

Co-orientadora: Dr^a. Patrícia Alves Reis

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Dr^a. Parícia Machado R. e Silva Martins – IOC – FIOCRUZ
Presidente

Dr. Felipe Dal Pizzol – Dep. de Medicina – Unesc
Membro

Dr. Eduardo Vera Tibiriçá – IOC – FIOCRUZ
Membro

Dr^a. Adriana Ribeiro Silva – IOC – FIOCRUZ
Membro Suplente e Revisora

Dr. Fabrício A. Pamplona – Instituto D’Or
Membro suplente

Rio de Janeiro, 11 de fevereiro de 2014

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original...”

Albert Einstein

Agradecimentos

A Deus por me iluminar e por me dar força nos momentos mais complicados e pela sabedoria, humor e amizade para com aqueles a minha volta.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, paciência, esforço, por acreditarem no meu sucesso e pelas horas de dedicação em me ensinar a sempre ir até o fim, mesmo que os obstáculos sejam enormes.

Ao Dr. Hugo Caire Castro de Faria Neto pela oportunidade de estar em seu laboratório, pela orientação e ensinamentos dados ao longo deste trabalho.

Ao Dr. Fernando Augusto Bozza pela orientação ao longo desses anos e confiança depositada em mim nessa longa caminhada no desenvolvimento deste trabalho.

A Carolina, pela cumplicidade, pelo companheirismo, pelas horas de conversa e carinho, e pelas horas de escutar meus desabafos e angústias.

A Dra. Patrícia Alves Reis por me guiar nesse caminho turbulento, por me dar a oportunidade de chegar até aqui. Sem sua amizade e carinho nada disso seria possível.

A José Dacasa e Maura responsáveis pelo biotério do Instituto Vital Brazil, pela imensa ajuda durante este trabalho e por terem feito com que ele fosse executável, mas principalmente pelo carinho e amizade.

Aos amigos Jaime Ribeiro Filho, Beatriz Guerreiro, Sally Liechocki, Roberta A Navarro Xavier, obrigado por tornarem meus dias no laboratório mais divertidos, por todos os bons momentos.

A Mariana de Moraes Pitombo, Raphaella Lima, Luciana Domett, Tathiany Igreja, pela amizade, inteligência e alegria de vocês, que contribuiu muito para minha maturidade científica e para o desenvolvimento deste trabalho. Levarei vocês comigo pra sempre!

Aos amigos do laboratório de Imunofarmacologia André Costa Ferreira, Monica Farah (sem você meus animais jamais chegariam), Flora Magno, Rachel Novaes, Mariana Cunha, Isabel Matos, Edson de Assis, Isacláudia Gomes, Cláudia Araújo, Alan Brito, Eugênio Hottz, Gabriel Gutfilen companheiros e amigos de bancada, muito obrigado por toda força, por toda energia positiva.

Agradeço a todo laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Dr. Eduardo Tibiriçá, em especial a Dra. Vanessa Estado por me ajudar nos experimentos de microscopia intravital e por momentos de atenção quando uma dúvida surgia.

Agradeço a todos do biotério do Pav. Ozório de Almeida, a todos os funcionários da limpeza, aos responsáveis pela portaria do pavilhão Alexandre Silva e “Seu” Antônio

e as secretárias do Pavilhão Tathy e Andreia pela ótima convivência e por serem sempre prestativos e solícitos. O meu muito obrigado!

Agradeço a Rose, pela ajuda sempre que necessário, amizade e carinho.

Aos componentes da banca pela gentileza de terem aceitado o convite.

A todos aqueles que me ajudaram de alguma maneira para que essa tese virasse realidade.

Aos órgãos de apoio à pesquisa CNPq, FAPERJ e à FIOCRUZ.

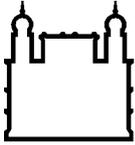
.

SUMÁRIO

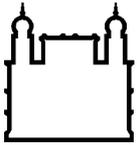
Resumo	X
Abstract	XI
Lista de Abreviaturas	XII
Lista de Tabelas	XIV
Lista de Figuras	XV
Lista de Quadros	XVIII
1. Introdução	1
1.1. Sepses	1
1.2. Epidemiologia	3
1.3. Fisiopatologia	4
1.3.1. Resposta Inflamatória	4
1.3.2. Mediadores Inflamatórios Solúveis	5
1.3.3. Células Polimorfonucleares e Estresse Oxidativo	8
1.3.4. Disfunção Vascular	10
1.4. Encefalopatia Associada a Sepses (EAS)	12
1.5. Fisiopatologia da EAS	14
1.5.1. Alterações na Barreira Hematoencefálica, Ativação Endotelial e Disfunção da Microcirculação	14
1.5.2. Ativação Glial e Excitotoxicidade	15
1.5.3. Estresse Oxidativo, Desequilíbrio Bioenergético e Disfunção Mitochondrial	17
1.6. Disfunção Cognitiva	19
1.7. Estatinas	21
1.7.1. Efeitos pleiotrópicos das Estatinas nas células endoteliais e coagulação	23
1.7.2. Efeitos pleiotrópicos anti-inflamatórios das Estatinas na sepses	25
1.7.3. Estatinas e dano cognitivo	25
2. Objetivos	27
3. Metodologia	28

3.1. Animais	28
3.2. Modelo sepse por injeção do sobrenadante fecal (ISC)	28
3.3. Avaliação do Escore Clínico	29
3.4. Coleta das amostras de soro e cérebro dos animais	30
3.5. Microscopia Intravital	31
3.6. Atividade de Mieloperoxidase (MPO) cerebral	32
3.7. Imunohistoquímica	32
3.8. Dosagem de citocinas e quimiocinas	33
3.9. Avaliação da peroxidação lipídica pela reação ao ácido tiobarbitúrico	33
3.10. Avaliação da integridade da barreira hematoencefálica	34
3.11. Teste de Esquiva Inibitória	34
3.12. Teste do labirinto aquático de Morris	34
3.13. Análise Estatística	35
4. Resultados	36
4.1. Padronização do Modelo	36
4.2. Análise de sobrevivência	36
4.3. Escore Clínico	37
4.4. Correlação entre Escore e Mortalidade	38
4.5. Caracterização do Dano Cognitivo	39
4.6. Análise do papel das estatinas sobre a mortalidade no modelo de ISC	41
4.7. Escore Clínico dos animais tratados com estatina	41
4.8. Efeito das estatinas nos níveis plasmáticos e cerebrais de IL-6 em 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal	42
4.9. Efeito das estatinas nos níveis plasmáticos e cerebrais de IL-1 β em 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal	44
4.10. Efeito das estatinas nos níveis plasmáticos e cerebrais de MCP-1/CCL2 em 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal	46
4.11. Efeito das estatinas nos níveis plasmáticos e cerebrais de	47

KC em 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal	
4.12. Efeito das estatinas nos níveis plasmáticos e cerebrais de IL-10 em 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal	49
4.13. Avaliação de estresse oxidativo no cérebro dos animais tratados com estatinas 6 e 24h após a infecção	50
4.14. Análise de Mieloperoxidase em 6 e 24 h no cérebro dos animais tratados com estatinas	51
4.15. Efeito da estatinas sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica por quantificação de Azul de Evans no cérebro dos animais 6 h após infecção	52
4.16. Análise da intensidade de fluorescência com anti-IBA-1 em 6 h no hipocampo dos animais tratados com estatina	53
4.17. Microscopia Intravital no cérebro dos animais tratados com estatina em 6 e 24 h	59
4.18. Teste de esquiva Inibitória animais tratados com estatina 15 dias após a ISC	63
4.19. Teste do labirinto aquático de Morris nos animais tratados com estatina 15 dias após a ISC	65
5. Discussão	67
6. Conclusões	78
7. Referências Bibliográficas	79

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ****Disfunção cerebral associada à sepse: papel das estatinas na prevenção do dano cognitivo em modelo de sepse experimental****RESUMO****TESE DE DOUTORADO****Pedro Celso Braga Alexandre**

A sepse é um dos mais graves problemas de saúde pública mundial, apresentando uma estimativa de 19 milhões de casos por ano. É caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica frente uma infecção. O cérebro é um dos primeiros órgãos a ser afetado. A disfunção no sistema nervoso central se manifesta tipicamente por delirium, déficit de atenção e dano cognitivo. As estatinas são fármacos que têm a capacidade de bloquear a enzima HMG-CoA redutase, reduzindo a síntese de colesterol endógeno. Recentemente, foi observado que as estatinas, apresentam efeitos anti-inflamatórios, com potencial para prevenir a disfunção cerebral em modelo experimental de malária cerebral. Objetivamos neste estudo avaliar a capacidade do tratamento das estatinas em reduzir a neuroinflamação e proteger do dano cognitivo no modelo (ISC) de sepse. Para isso, foi coletado o conteúdo cecal, diluído em solução salina, e centrifugado, sendo sobrenadante recolhido para administração nos animais por via (i.p.) na dose de 5 mg/g (0,5 mL) (n = 5-8/grupo). Os controles receberam 0,5 mL de solução salina. Os animais foram tratados 6, 24 e 48 h após a indução da sepse com imipenem (30 mg/kg de peso corporal, por via subcutânea – s.c.) e 1,0 ml de solução salina (s.c.). As estatinas (atorvastatina e simvastatina) foram administrados v.o. 1 hora antes e 6, 24 e 48 h após a infecção (20 mg/kg). A mortalidade foi observada por 96 h e um escore de gravidade avaliado. O perfil de citocinas inflamatórias, o dano oxidativo e os níveis de mieloperoxidase foram determinados em 6 e 24 h. Além disso, foram avaliados a adesão e rolamento de leucócitos foram avaliados no cérebro dos animais a ativação da microglia, a disfunção da barreira hematoencefálica e alterações na microcirculação vascular cerebral. Após 15 dias analisamos o dano cognitivo utilizando testes comportamentais de esQUIVA inibitória e o labirinto aquático de Morris. Não observamos diferença significativa no percentual de sobrevivida comparando os animais que receberam injeção do sobrenadante cecal (ISC) tratados (56%, 53%) com os animais ISC sem tratamento (37%). Observamos níveis significativamente mais baixos de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6) e quimiocinas (KC/CXCL1 e MCP-1/CCL2) quando comparamos animais ISC tratados e não-tratados. Observamos também uma diminuição no dano oxidativo no cérebro 6 h após a indução da sepse nos grupos tratados com estatina. Observamos que o tratamento com estatinas conferiu proteção à microvasculatura capilar em 24 h, com redução da adesão e rolamento de leucócitos e dos níveis de MPO 6 e 24 h após a indução da sepse Além disso, o tratamento com estatinas foi capaz de proteger os animais ISC do dano cognitivo recuperando a memória aversiva e a memória espacial. Podemos concluir que as estatinas protegeram os animais do dano cognitivo no modelo de sepse induzida pela ISC, reduzindo níveis de mediadores inflamatórios e disfunção microvascular cerebral. Desta forma, as estatinas, podem ser alvos terapêuticos interessantes para futuros ensaios clínicos focados na prevenção do declínio cognitivo gerado pela sepse.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Disfunção cerebral associada à sepse: papel das estatinas na reversão do dano cognitivo em modelo de sepse experimental

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Pedro Celso Braga Alexandre

Sepsis is one of the most serious problems in worldwide public health, with an estimated 19 million cases a year. It is characterized by a systemic inflammatory response against infection. The brain is one of the first organs to be affected. The dysfunction in the central nervous system (CNS) is typically manifested by delirium, cognitive impairment and attention deficit. The statins are drugs with the ability to inhibit the HMG-CoA reductase enzymatic activity, reducing endogenous cholesterol synthesis. Recently, it was observed that statins have anti-inflammatory effects, with the potential to prevent brain dysfunction in an experimental model of cerebral malaria. We aimed in this study to evaluate the capacity of statins to reduce neuroinflammation and protect from cognitive impairment in an experimental model of sepsis (CSI). For this purpose, the cecal content was collected, diluted in saline solution and centrifuged, and the supernatant collected for administration in animals (i.p.) at a dose of 5 mg/g (0.5 mL) (n= 5-8/grupo). The controls received 0.5 mL of saline. The animals received antibiotic therapy 6, 24 and 48 hours after induction of sepsis with imipenem (30 mg/kg, subcutaneously - s.c.) and 1.0 ml of saline (s.c.). Statins (atorvastatin and simvastatin) were administered orally 1 h before and 6, 24 and 48 h post-infection (20 mg/kg). Mortality was observed for 96 h and a clinical score reported. The profile of cytokines, oxidative stress and myeloperoxidase levels were determined at 6 and 24 h. Moreover, adhesion and rolling of leukocytes in brain, microglial activation, dysfunction of the blood brain barrier (BBB) and vascular changes in the cerebral microcirculation were assessed. After 15 days we analyzed the cognitive impairment using behavioral tests of inhibitory avoidance task and Morris Water Maze. There was no significant difference in survival curve comparing the percentage of animals that received cecal supernatant (ISC) treated with atorvastatin and simvastatin (56%, 53%) with ISC untreated animals (37%). We observed significantly lower levels of proinflammatory chemokines (KC/CXCL1 and MCP-1/CCL2) and cytokines (IL-1, IL-6) when comparing untreated or statin-treated animals. We also observed a decrease in oxidative stress in the brain 6 hours after induction of sepsis in ISC-stimulated groups. We observed that treatment with statins protected the capillary microvasculature within 24 h, with reduced adhesion and rolling of leukocytes and MPO levels 6 and 24 h after sepsis induction. Furthermore, treatment with statins was able to protect animals from cognitive impairment recovering both aversive and spatial memory. We can conclude that statins protected animals from cognitive damage in ISC model of sepsis by reducing levels of inflammatory mediators and cerebral microvascular dysfunction. Thus, statins seem to be interesting therapeutic targets for future clinical trials focused on prevention of cognitive decline generated by sepsis.

Lista de Abreviaturas

Akt/PKB: Proteína kinase B

BHE: Barreira Hematoencefálica

CL: Colesterol livre

CLSM: Microscopia de escaneamento a laser confocal

CO: Monóxido de carbono

CO₂: Dióxido de carbono

Cox-1: Ciclooxigenase-1

Cox-2: Ciclooxigenase-2

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

EAS: Encefalopatia Assciada a Sepse

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGFR: Receptor do fator de crescimento epidermal

EIA: Ensaio imunoenzimático

ELISA: Imunoensaio Enzimático

eNOS: Oxido nítrico sintase endotelial

HDL: Lipoproteína de alta densidade

IFN γ : Interferon gama

IL-10: Interleucina-10

IL1b: Interleucina-1 beta

IL-6: Interleucina-6

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida

ISC: Injeção do Sobrenadante Cecal

KC/CXCL1: Quimioatrativo de queratinócitos

LPS: Lipopolissacarídeo

LTM: Memória de longa duração

MCP-1/CCL2: Proteína quimiotática de monócitos-1

MDA: Malondialdeído

MMP: Metaloproteinase

MPO: Mieloperoxidase

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

MyD88: Gene de resposta primária da diferenciação mielóide 88

NaCl: Cloreto de sódio

NaF: Fluoreto de sódio

NaNO₂: Nitrito de sódio

NFκB: Fator nuclear kapa B

NO: Óxido nítrico

PAI-1: Inibidor da ativação de plasminogênio 1

PBS: Tampão fosfato de sódio

PGE₂: Prostaglandina E₂

PGI₂: Prostaglandina I₂

PI3K: Fosfatidilinositol-3-kinase

PLA₂: Fosfolipase A₂

PPAR: receptor ativado por proliferadores de peroxissomos

RE: Retículo endoplasmático

SR-B1: receptor scavenger classe B1

SNC: Sistema nervoso central

STM: memória de curta duração

t-PA: Ativador do plasminogênio tecidual

TLR4: Receptor semelhante a toll 4

TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa

TSA: Tryptic Soy Agar

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Definições da sepse	2
Tabela 3.2: Pontuação que estabelece a ausência e gravidade da sepse	31

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Alterações na coagulação durante a sepse	10
Figura 1.2 - Representação do processo de infecção com alterações funcionais	13
Figura 1.3 - Farmacodinâmica dos inibidores da HMG-CoA redutase	22
Figura 1.4 - Efeito na circulação vascular das estatinas	24
Figura 3.1 - Grupos utilizados no desenvolvimento do presente estudo	29
Figura 4.1 - Quantificação de UFC	36
Figura 4.2 - Análise de sobrevivência durante 96 h após a injeção do macerado cecal ISC	37
Figura 4.3 - Quantificação e qualificação da gravidade da sepse	37
Figura 4.4 – Caracterização do dano cognitivo pelo teste de esQUIVA inibitória	40
Figura 4.5 – Efeito das estatinas sobre curva de sobrevivência após ISC	41
Figura 4.6 - Efeito do tratamento com estatinas na quantificação e qualificação da gravidade da sepse.	42
Figura 4.7 - Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de IL-6 no plasma dos animais Swiss Webster	43
Figura 4.8 - Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de IL-6 no cérebro dos animais SW	44
Figura 4.9 - Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de IL-1 β no plasma dos animais SW	45
Figura 4.10 - Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de IL-1 β no cérebro dos animais SW	45
Figura 4.11 - Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de	46

MCP-1/CCL-2 no plasma dos animais SW

Figura 4.12 - Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de MCP-1/CCL-2 no cérebro dos animais SW **47**

Figura 4.13 - Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de KC/CXCL1 no plasma dos animais SW **48**

Figura 4.14 - Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de KC/CXCL1 no cérebro dos animais SW **48**

Figura 4.15 – Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de IL-10 no plasma dos animais SW **49**

Figura 4.16 – Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de IL-10 no cérebro dos animais SW **50**

Figura 4.17 – Efeito do tratamento com estatinas sobre os níveis de MDA no cérebro dos animais SW **51**

Figura 4.18 – Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de mieloperoxidase no cérebro dos animais SW **52**

Figura 4.19 – Avaliação do edema cerebral pela quantificação de azul de Evans **52**

Figura 4.20 – Intensidade de Fluorescência de IBA-1 na região CA1 do hipocampo dos animais SW **53**

Figura 4.21 – Intensidade de Fluorescência de IBA-1 na região GD do hipocampo dos animais SW **54**

Figura 4.22 – Intensidade de Fluorescência de IBA-1 na região CA3 do hipocampo dos animais SW **55**

Figura 4.23. Fotomicrografia representativa da marcação de fluorescência para IBA-1 na região CA1 do hipocampo dos animais SW **56**

Figura 4.24. Fotomicrografia representativa da marcação de fluorescência para IBA-1 na região GD do hipocampo dos animais SW **57**

- Figura 4.25.** Fotomicrografia representativa da marcação de fluorescência para IBA-1 na região CA3 do hipocampo dos animais SW **58**
- Figura 4.26.** Efeitos do tratamento com estatinas sobre a microcirculação cerebral de animais SW **59**
- Figura 4.27.** Fotomicrografias representativas da microcirculação da membrana pial de animais SW **60**
- Figura 4.28.** Efeitos do tratamento com estatinas sobre a microcirculação cerebral de animais SW **61**
- Figura 4.29.** Fotomicrografias representativas da microcirculação da membrana pial de animais SW **62**
- Figura 4.30.** Avaliação de perda de memória aversiva no modelo de esquiiva inibitória **64**
- Figura 4.31.** Avaliação de perda de memória espacial no modelo de labirinto aquático de Morris **65**
- Figura 4.32.** Avaliação de perda de memória espacial no modelo de labirinto aquático de Morris **66**

Lista de Quadros

Quadro 3.1 - Escore Clínico definido por 12 parâmetros a fim de estabelecer gravidade da sepse	30
---	-----------

1- INTRODUÇÃO

1.1- SEPSE

A origem da palavra sepse deriva do grego “σηψις”. Significa decomposição ou putrefação. A sepse foi primeiramente descrita por Hipócrates, há aproximadamente 2700 anos (Schulte, W., *et al.*, 2013). É caracterizada por uma resposta inflamatória amplificada e subsequentemente desregulada a uma infecção por microorganismos (Vandijck, D., *et al.*, 2006). Apresenta uma complexa interação de moléculas inflamatórias, afetando diversos grupos de pacientes, especialmente imunocomprometidos, idosos e pacientes criticamente enfermos (Vincent, J.L., Korkut, H.A. 2008).

A complexidade da resposta inflamatória, com um desequilíbrio caracterizado entre os mediadores pro e anti-inflamatórios e as disparidades na mortalidade de pacientes acometidos criaram dificuldade na conduta clínica. Em 1991, na Conferência de Consenso do American College of Chest Physicians e da Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) foram estabelecidos os parâmetros para definição da sepse e instituídas diretrizes para um diagnóstico mais precoce, melhora no tratamento e facilitação de novas pesquisas (Bone, R.C., *et al.*, 1992). Os membros da conferência acordaram um grupo de definições aplicadas aos pacientes em diferentes estágios da sepse: bacteremia, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), sepse, sepse grave, choque séptico e a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) (Tabela 1) (Bone, R.C. 1993).

Um resultado chave nesse consenso foi a introdução do termo Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS), definido como “*uma combinação de sinais clínicos em resposta a um estímulo inicial como trauma, queimaduras, choque hipovolêmico ou hemorrágico, pancreatite entre outros, sem a existência de uma infecção*”. (Bone, R.C., *et al.*, 1992). Quando essa resposta inflamatória sistêmica está associada a evidência clínica de infecção é realizado o diagnóstico de sepse. Essa resposta inflamatória contra os microrganismos infecciosos pode se desenvolver de forma sistêmica produzindo uma complicação da sepse, caracterizada por uma coagulação intravascular disseminada (CID), hipoperfusão tecidual, extravasamento de líquido extracelular, gerando uma síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO). Na SDMO existe a alteração da função dos órgãos e através de intervenção pode ocorrer a manutenção da homeostase. O controle do volume plasmático faz-se necessário e caso não ocorra, ou seja não

responsivo, a hipotensão arterial associada ao quadro levará a uma falência circulatória marcada, caracterizando o choque séptico (Schulte, W., *et al.*, 2013).

Tabela 1.1: Definições de sepse

INFECÇÃO	Fenômeno caracterizado por uma resposta inflamatória à presença de microrganismos ou à invasão de tecidos do hospedeiro normalmente estéreis por esses organismos.
BACTEREMIA	Presença de bactérias viáveis no sangue.
SRIS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica, caracterizada por duas ou mais das seguintes condições: - Febre (temperatura corporal >38o C) ou hipotermia (temperatura corporal <36o C) - Taquipnéia (FR >20 ipm) ou hiperventilação (PaCO2 <32 mmHg) - Taquicardia (freqü.ncia cardíaca >90 bpm) - Leucocitose (leucometria total >12.000/mm3), leucopenia (Leucometria total <4.000/ mm3) ou presença de neutrófilos imaturos ("bastões") >10% do total.
SEPSE	Resposta sistêmica a infecção, mais SIRS caracterizada por mais de dois dos sinais: - Febre (temperatura corporal >38o C) ou hipotermia (temperatura corporal <36°C) - Taquipnéia (FR >20 ipm) ou hiperventilação (PaCO2 <32 mmHg) - Taquicardia (frequencia cardíaca >90 bpm) - Leucocitose (leucometria total >12.000/ mm3), leucopenia (leucometria total <4.000/mm3) ou presença de neutrófilos imaturos ("bastões") >10% do total.
SEPSE GRAVE	Sepse associada a disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão: - Hipoxemia (PaO2/FiO2 <280) - Aumento do lactado plasmático (acima do limite normal superior) - Oligúria (<0,5 ml/kg/h) - Alteração do estado de consciência
CHOQUE SÉPTICO	Diagnóstico clínico de sepse grave mais hipotensão (<90 mmHg ou queda maior ou igual a 40 mmHg abaixo dos valores habituais de pressão) por pelo menos 1 hora e não responsivo à reposição volêmica.
SDMO	É a presença de alterações da função orgânica em pacientes críticos, de forma que a homeostase sistêmica não possa ser mantida sem intervenções.

Adaptado de (Bone, R.C., *et al.*, 1992)

A partir da publicação das diretrizes em 1992, ocorreram muitas críticas sobre os critérios de diagnóstico que apresentavam baixa especificidade e com menor valor prognóstico. Em 2001 foi realizado um novo consenso da ACCP/SCCM com objetivo de rever os parâmetros pré-definidos para diagnosticar a sepse. Foi sugerida a inserção de parâmetros mais específicos, que incluíam fatores de predisposição para o desenvolvimento da sepse, a extensão da infecção (localizada ou sistêmica), presença e magnitude de disfunções orgânicas e avaliação da

resposta imune. Esse novo grupo de critérios ficou conhecido como PIRO (*Predisposition, Insult, Response, Organ dysfunction*) (Levy, M.M., *et al.*, 2003).

As alterações feitas no consenso de 2001 foram analisadas no estudo comparativo de Weiss e cols., em 2009, com as diretrizes de 1992, com relação as prevalências de diferentes estágios da sepse e em relação as taxas de mortalidade em UTIs. As maiores taxas de prevalência apareceram quando foram seguidas as diretrizes revisadas em 2001 e as maiores taxas de mortalidade apareceram seguindo as definições de 1992 (Weiss, M., *et al.*, 2009).

1.2 – EPIDEMIOLOGIA

A sepse e o choque séptico constituem um dos mais graves problemas de saúde pública mundial, sendo a causa principal de mortalidade nas unidades de terapia intensiva (UTIs) nos EUA e na Europa. As taxas de mortalidade na maioria dos estudos realizados estão entre 30 a 60% para sepse e suas complicações (Skirecki, T., *et al.*, 2012).

Um estudo epidemiológico realizado com 14.364 pacientes internados em 28 UTIs de hospitais de 8 países europeus, verificou que 80% dos sítios de infecção eram no trato respiratório, digestivo, urinário ou em infecções da corrente sanguínea. Cerca de 28% das infecções foram associados com sepse, 24% com sepse grave, 30% com choque séptico e 18% não foram classificadas. Taxas de mortalidade hospitalar variaram de 16,9% em pacientes não infectados para 53,6% em pacientes com infecções hospitalares no momento da admissão na UTI e aquisição de infecção durante a internação na UTI (Alberti, C., *et al.*, 2002)

Nos EUA a sepse está entre as principais causas de morte, com cerca de 750.000 novos casos por ano, o que representa entre 40% a 60% do total de internações nas UTIs americanas. Isso resultou em mais de 380.000 internações em UTIs e aproximadamente 215.000 desses casos foram a óbito, gerando uma despesa de recursos do sistema de saúde de 45.000 dólares por paciente, o que no total dos casos produziu um gasto total estimado de 17 bilhões de dólares ao ano (Burchardi, H., Schneider, H. 2004, Angus, D.C., *et al.*, 2001).

No Brasil, segundo dados do DATASUS, entre junho do ano de 2012 até junho do ano de 2013, ocorreram 86.798 internações de pacientes com sepse na rede hospitalar gerenciada pelo SUS, onde 37.494 desse total de internações foram a óbito. A taxa de mortalidade no período foi de 43,20%, sendo que a região sudeste foi a que concentrou o maior número de casos e, por conseguinte, foi a região com a

maior taxa de mortalidade: 48,17%. Essas internações custaram aos cofres do governo aproximadamente 287 milhões de reais, no período (DATASUS, 2013).

1.3 - FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

1.3.1 – Resposta Inflamatória

O sistema imune inato desempenha um papel importante na resposta inicial à invasão dos patógenos aos tecidos. A imunidade inata é denominada como a primeira linha de defesa do organismo resultando na atração e ativação das células efetoras como os macrófagos, neutrófilos, células *natural killer* (NK). Células essas que são capazes de agir diretamente contra os microrganismos invasores através de dois mecanismos: por fagocitose ou pela liberação de moléculas reativas provocando o *killing* desses microrganismos. Conjuntamente à ativação das células efetoras, ocorre ainda a ativação da cascata do sistema complemento, com liberação do fator C5a. Além disso, há a liberação de citocinas e moléculas coestimuladoras do sistema imune adaptativo (Hansen, J.D., *et al.*, 2011).

O sistema imune inato apresenta a capacidade de detectar os patógenos invasores, através do reconhecimento de estruturas como o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias Gram-negativas, o ácido lipoteicóico das bactérias Gram-positivas, a dupla fita de RNA dos vírus entre outras. Essas moléculas são conhecidas como padrões moleculares associadas aos patógenos (PAMPs). A detecção desses padrões moleculares é realizada por receptores, expressos nas células da imunidade inata como os macrófagos, conhecidos como receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (Medzhitov, R., Janeway, C., Jr. 2000). Os receptores da família do tipo Toll-like (TLR) localizados na superfície celular e os receptores do tipo NOD (domínios de oligomerização de ligação de nucleotídeos) presentes no citosol são exemplos de PRRs, que em geral, fazem o reconhecimento dos PAMPs, resultando em fagocitose e/ou em ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias (Wiersinga, W.J., *et al.*, 2013).

A ativação da cascata de sinalização intracelular leva a estimulação de fatores de transcrição gênica, como o fator nuclear KB (NF- κ B) que sofre translocação ao núcleo celular e induz em particular genes relacionados a moléculas que participam da resposta imune, como aqueles responsáveis pela expressão de diversas citocinas, quimiocinas e o óxido nítrico (NO). Na sepse ocorre a liberação

dessas moléculas pró-inflamatórias como as interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, IL-12, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF)- α e o Interferon gama (IFN)- γ e as quimiocinas como a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1/CCL2) e IL-8 na chamada “cascata de citocinas” (Akira, S., *et al.*, 2006, Marie, C., *et al.*, 1996). Em contrapartida a essa resposta pró-inflamatória, ocorre a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-13 e o fator de transformação de crescimento beta (TGF)- β . Essas citocinas possuem a capacidade de inibir a síntese das moléculas inflamatórias e com isso, permitem restaurar o equilíbrio imunológico (Schulte, W., *et al.*, 2013).

1.3.2– Mediadores Inflamatórios Solúveis

Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina-1 (IL-1)

As citocinas pró-inflamatórias desempenham papel chave como efetoras da resposta imune e reguladoras da atividade celular. TNF- α e IL-1 são responsáveis por muitos dos efeitos fisiopatológicos observados na sepse (Wiersinga, W.J., *et al.*, 2013). Ambas são mediadores agudos da resposta inflamatória, sendo liberadas 30-90 min após estímulo e possuem ação sinérgica em várias situações. Elas interagem com seus receptores específicos: (TNFR1) e (TNFR2) para TNF- α , e (IL-1R1) e (IL-1R2) para IL-1 e ativam a síntese e a liberação de outras citocinas, quimiocinas, e também de mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Thijs, L.G., Hack, C.E. 1995).

Tanto IL-1 quanto TNF- α são capazes de provocar mudanças hemodinâmicas e hematológicas típicas das encontradas no choque séptico (Okusawa, S., *et al.*, 1988). TNF- α aumenta a diferenciação de macrófagos pelas células progenitoras e promove a ativação e migração dessas células, prolongando a sobrevivência. IL-1 induz mudanças sistêmicas associadas com a infecção e a lesão tecidual, tais como febre, neutrofilia e aumento nos níveis de cortisol. Ambas citocinas também estimulam o aumento da expressão de moléculas de adesão, como da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1), no endotélio. Ativam a cascata de coagulação, levando a um aumento da expressão de fator tecidual (TF) e do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), assim como a inibição de trombosmodulina. Essas alterações geram um estado pró-coagulante. (Blackwell, T.S., Christman, J.W. 1996).

Interleucina-6 (IL-6)

A síntese de IL-6 é realizada por uma variedade de células, especialmente macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e músculo liso em resposta a estimulação por LPS, IL-1 e TNF- α . A IL-6 atua através da ligação com seu receptor transmembrana (IL-6R) provocando a síntese e liberação de proteínas de fase aguda no fígado, como da proteína C reativa (PCR), levando a ativação de linfócitos B e T, além da ativação da cascata de coagulação, e modulação da hematopoiese. IL-6 leva ainda ao aumento da expressão endotelial de moléculas de adesão como ICAM-1, possibilitando uma maior migração de neutrófilos para o foco infeccioso (Blackwell, T.S., Christman, J.W. 1996). Além disso, existem algumas evidências de que a IL-6 inibe a apoptose de neutrófilos, aumentando sua sobrevivência (Fanning, N.F., *et al.*, 1999). Ela também é capaz de induzir febre (em uma intensidade menor que IL-1 e TNF- α), e pode inibir a síntese de IL-1 e TNF- α , *in vitro*, induzida por LPS (Schulte, W., *et al.*, 2013). Existe assim uma forte correlação entre as concentrações de IL-6, com a gravidade, a SDMO e a morte ocasionada pela sepse do que com outras citocinas (Blackwell, T.S., Christman, J.W. 1996).

Interleucina-10 (IL-10)

A síntese de citocinas anti-inflamatórias parece ser um pré-requisito para a redução e o controle da resposta inflamatória. A IL-10 foi primeiramente descrita como sendo sintetizada por linfócitos T CD4⁺ (Th2), linfócitos T $\gamma\delta$, linfócitos B, monócitos/macrófagos, células NK, neutrófilos e células epiteliais. Entre os principais estímulos para sua produção estão o LPS e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1. Animais geneticamente modificados para uma menor síntese de IL-10, são mais vulneráveis ao estímulo por LPS e apresentam maior síntese de TNF- α (Berg, D.J., *et al.*, 1995). IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que apresenta como principais efeitos a inibição da ativação de macrófagos e neutrófilos, inibição da síntese de citocinas como: TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 por macrófagos ativados. (Marchant, A., *et al.*, 1994). Além disso, é caracterizada por reduzir a síntese de espécies reativas de oxigênio ROS, NO e redução da síntese de prostaglandinas, bem como a desgranulação e quimiotaxia de neutrófilos. Em relação aos linfócitos, induz crescimento e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, estimula a síntese de imunoglobulinas, promovendo a resposta imune humoral (Schulte, W., *et al.*, 2013). Durante a sepse e o choque séptico ocorre um aumento nos níveis

plasmáticos de IL-10 (Marchant, A., *et al.*, 1994, Gomez-Jimenez, J., *et al.*, 1995). Contudo, esses níveis de IL-10 mais elevados, com uma razão IL-10/TNF- α aumentada na sepse, foram correlacionados com um pior prognóstico da doença (Gogos, C.A., *et al.*, 2000).

Quimiocinas (MCP-1 e IL-8)

As citocinas quimioatrantes também chamadas de quimiocinas estão envolvidas na regulação do tráfego de leucócitos através de interações com seus receptores. Esses são membros de uma superfamília de receptores transmembrana associados a proteína G que incluem receptores de hormônios, neurotransmissores, substâncias parácrinas entre outros (Murphy, P.M. 1994). As quimiocinas são divididas em 4 famílias (CXC, CX₃C, CC e C) classificadas de acordo com a posição do par de aminoácido cisteína. As quimiocinas da subfamília CXC são tipicamente quimioatrantes de neutrófilos, enquanto as CC são quimioatrantes de células mononucleares (Luster, A.D. 1998). A interação das quimiocinas com os receptores inicia uma série de alterações bioquímicas e celulares que incluem modificações em fluxos de íons, expressão de integrinas (CD11a:CD18) e potencial transmembrana, além de alterações na forma da célula, secreção de enzimas lisossômicas, produção de ânion superóxido e locomoção aumentada (Murdoch, C., Finn, A. 2000).

A proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1/CCL2) é um protótipo das quimiocinas da subfamília CC, que possui atividade de quimiotaxia de monócitos; células T, células NK, basófilos e eosinófilos (Baggiolini, M., *et al.*, 1994), através de estimulação por endotoxinas e pelas citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 (Matsukawa, A., *et al.*, 1999). MCP-1/CCL2 é expressa em diversos tipos celulares como fibroblastos, células endoteliais, monócitos e macrófagos. Alguns estudos demonstraram a relação da quimiocina com doenças caracterizadas por um rico infiltrado monocítico como na aterosclerose (Leonard, E.J., Yoshimura, T. 1990), na artrite reumatoide (Koch, A.E., *et al.*, 1992) e na fibrose pulmonar (Car, B.D., *et al.*, 1994). Na sepse, é descrito um papel relevante na quimiotaxia de monócitos e indiretamente na de neutrófilos, pelo aumento da síntese de leucotrieno (LTB₄) (Matsukawa, A., *et al.*, 1999). Além disso, foi descrito um aumento na síntese de MCP-1/CCL2, principalmente em pacientes com sepse grave ou choque séptico (Bossink, A.W., *et al.*, 1995) o que é essencial para a eliminação bacteriana na doença (Gomes, R.N., *et al.*, 2013).

A IL-8/CXCL8 é uma pequena proteína que pertence a subfamília de quimiocinas CXC na espécie humana, e possui como análogo KC nos murinos. A IL-8 é produzida por fagócitos mononucleares, leucócitos polimorfonucleares, células endoteliais, células epiteliais e uma variedade de tipos de células mesoteliais, em resposta a vários estímulos, incluindo a endotoxina, a IL-1 e o TNF- α (Blackwell, T.S., Christman, J.W. 1996). Foi inicialmente caracterizada como um fator quimiotático de neutrófilos para o sítio de inflamação (Baggiolini, Walz et al. 1989). Também produz quimiotaxia de linfócitos T e basófilos em concentrações nanomolares e tem sido relacionada a fatores de angiogênese em patologias como artrite reumatoide (Koch, A.E., et al., 1992). A IL-8/CXCL8 se liga a dois receptores com igual afinidade o CXCR1 e o CXCR2. No neutrófilo a IL-8 induz a expressão de L-selectina, de integrinas como CD11b/CD18 e do receptor para complemento Tipo 1 (CR1/CD35). Ainda estimula a secreção de enzimas granulares, aumenta a atividade fagocítica, bem como a capacidade de adesão e migração de neutrófilos. Alguns mediadores lipídicos como leucotrienos e Fator ativador plaquetário (PAF) também tem síntese aumentada (Mukaida, N. 2003). Na sepse em humanos e primatas, níveis de IL-8 tem correlação com a gravidade da doença, e apresenta picos plasmáticos mais tardios que TNF- α e IL-1, estando mais associado a cinética plasmática de IL-6 (Van Zee, K.J., et al., 1991).

1.3.3 – Células Polimorfonucleares e Estresse Oxidativo

Na sepse a síntese de citocinas pró-inflamatórias no sítio infeccioso é responsável pelo recrutamento e ativação de leucócitos circulantes no plasma, que vão mediar as defesas do organismo (Benjamim, C.F., et al., 2002). Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) compreendem dois-terços do total de leucócitos no sangue periférico. Durante uma infecção, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a migrarem para o tecido, desempenhando um papel chave na resposta imune inata. Essas células quando ativadas são capazes de produzir e liberar mediadores pró-inflamatórios como IL-1 e MCP-1/CCL2, aumentando o recrutamento e a ativação de mais neutrófilos, linfócitos e monócitos (Yamashiro, S., et al., 2001). Os mastócitos contribuem para esse aumento do recrutamento neutrófilos ao local da infecção. Foi demonstrado em animais que apresentaram diminuição na atividade dos mastócitos, uma síntese diminuída de TNF- α , com menor recrutamento de neutrófilos apresentando maior taxa de mortalidade (Seeley, E.J., et al., 2012).

Os neutrófilos possuem um grande maquinário responsável pelo *killing* bacteriano, que é altamente eficiente e multivariado, desempenhando um papel crucial no controle do crescimento da bactéria e na disseminação do microorganismo (Torres-Duenas, D., *et al.*, 2007). A redução da ativação e migração dos neutrófilos para sítios de infecção está associada a um pior prognóstico na sepse. Uma falha na migração de neutrófilos na sepse grave proporciona um maior crescimento bacteriano, seguido por uma redução da taxa de sobrevivência (Alves-Filho, J.C., *et al.*, 2008). Uma vez atraídos para os locais de infecção, os neutrófilos se unem de forma reversível com proteínas da família das selectinas (E-selectina) expressas pelas células endoteliais, possibilitando o mecanismo de rolamento, na superfície endotelial. Subsequentemente, ocorre a transição do rolamento para adesão pela ligação a ICAM-1, na superfície das células endoteliais ativadas, com posterior diapedese para o tecido (Foxman, E.F., *et al.*, 1997, Muller, W.A. 2003).

Além da capacidade de reconhecimento e fagocitose dos patógenos nos sítios de infecção, os neutrófilos podem formar paralelamente, um complexo enzimático conhecido como: NADPH oxidase (Segal, A.W., Meshulam, T. 1979). Esse complexo, que também é expresso nos eosinófilos, monócitos e macrófagos, é essencial para eficácia na eliminação dos patógenos, sendo capaz produzir ROS como o ânion superóxido (O_2^-) através da transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular (O_2) no interior do vacúolo fagocítico (Cross, A.R., Segal, A.W. 2004). A atividade da NADPH oxidase coincide com a liberação do conteúdo dos grânulos neutrofilicos, que são ricos em enzimas lisossomais como a mieloperoxidase (MPO) (Segal, A.W., *et al.*, 1980).

A MPO constitui 5% do total de proteínas sintetizadas pelos neutrófilos, presente em altas concentrações nos grânulos azurófilos. É uma heme-peroxidase clássica que utiliza como substrato o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzindo espécies reativas, como o ácido hipocloroso (HOCL), que é um potente agente antimicrobiano, e um radical tirosil (Hampton, M.B., *et al.*, 1998). Ambas as moléculas são extremamente reativas, podendo causar danos teciduais, sendo a via de liberação de MPO caracterizada por geração de dano oxidativo (Shao, B., *et al.*, 2010). Paralelamente a liberação de MPO, ocorre a ativação das vias de transdução de sinal via ativação da superfamília de pequenas GTPases (Ras/Raf) conjuntamente com a proteína kinase ativada por mitógeno (MAP kinase) e da via de NF- κ B, ativando os genes da enzima da óxido nítrico sintase induzida (iNOS),

que uma vez ativada catalisa a elevação da síntese de NO (Lever, A., Mackenzie, I. 2007).

Existem evidências de que os neutrófilos podem induzir um aumento na síntese de iNOS durante a sepse (Wheeler, M.A., *et al.*, 1997). As altas concentrações de NO são capazes de se ligar ao ânion superóxido (O_2^-), formando peroxinitrito ($ONOO^-$) uma espécie reativa de nitrogênio (RNS). O NO pode ser oxidado em nitrito (NO_2^-), o qual é substrato para o conjugado MPO- H_2O_2 originando o radical de nitrogênio dióxido (NO_2). A interação entre $ONOO^-$ com NO_2 , gera 3-nitrotirosina que é uma RNS capaz de promover lesão na parede endotelial e aumento da inflamação (Shao, B., *et al.*, 2010). O peroxinitrito contribui para redução da interação neutrófilo/endotélio e conjuntamente com aumento de iNOS e de NO provocam a redução da migração dos neutrófilos para o sítio da infecção durante a sepse (Alves-Filho, J.C., *et al.*, 2005, Torres-Duenas, D., *et al.*, 2007).

Outro mecanismo de defesa desempenhado pelos neutrófilos contra os patógenos é a formação das redes extracelular de neutrófilos (NETs) (Brinkmann, V., *et al.*, 2004). Essas estruturas são compostas por filamentos de DNA, proteínas nucleares como cromatina ou isoformas de histonas (H1, H2A, H2B, H3, H4), além de proteínas granulares secretadas como serina proteases, elastase e catepsina G (Gardiner, E.E., Andrews, R.K. 2012). Essas regulam a interação e adesão dos neutrófilos com as plaquetas, caracterizando uma rápida e complementar resposta pró-coagulante ao processo de fagocitose para controle da infecção. A formação das NETs se dá em resposta a estímulos aos neutrófilos como endotoxinas bacterianas, como o LPS ou outros fatores (Pham, C.T. 2006).

1.3.4 – Disfunção Vascular

A exacerbação da síntese e liberação dos mediadores inflamatórios associados ao aumento do estresse oxidativo provoca uma disfunção circulatória sistêmica com efeitos na microcirculação, alterações essas que são caracterizadas por uma diminuição da densidade capilar funcional, e produzem um quadro de coagulação intravascular disseminada (CID) (Voves, C., *et al.*, 2006). A CID pode ser encontrada nos pacientes com sepse e tem uma forte correlação com a mortalidade (Taccone, F.S., *et al.*, 2010).

O parâmetro mais marcante da disfunção da coagulação na sepse está no desequilíbrio entre a formação de fibrina intravascular e a capacidade de

anticoagulação (Figura 1.1) (Levi, M.,van der Poll, T. 2008). Na sepse as citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6 produzem efeitos tanto na ativação da cascata de coagulação quanto na inibição da fibrinólise. A lesão endotelial leva à exposição do fator tecidual (TF), também presente nos grânulos dos monócitos, com posterior ligação e ativação do fator VII a VIIa. O complexo TF-VIIa ativa fator X a fator Xa, o qual ativará protrombina em trombina. A trombina irá clivar o fibrinogênio em monômeros de fibrina (MF) e ativação do fator XIII, o qual produz uma ligação covalente cruzada sobre MF, formando o coágulo estável (Levi, M., *et al.*, 2012).

Esse estímulo pró-coagulante (mediado pelo fator tecidual) compete com a redução dos mecanismos endógenos anticoagulantes (mediado pela atividade da proteína C, da antitrombina e da via de inibição do fator tecidual), somados a inibição da fibrinólise. Ocorre o aumento do inibidor da ativação do plasminogênio tipo-1 (PAI-1) (Angus, D.C.,van der Poll, T. 2013). Com isso, surgem os depósitos de fibrina associados ao comprometimento da permeabilidade vascular, que provocam uma obstrução da microcirculação resultando num processo de perda da densidade capilar, alteração no fluxo sanguíneo e com redução a níveis abaixo do basal na perfusão capilar (Zeerleder, S., *et al.*, 2005).

A oxigenação tecidual é ainda prejudicada pela perda da função de barreira do endotélio, devido a uma redução da função da caderina vascular endotelial (VE-caderina), alterações nas junções endoteliais célula-célula, níveis elevados de angiopoietina 2, e uma quebra no equilíbrio entre receptores de fosfato de esfingosina-1 e 3 (S1P1, S1P3) dentro da parede vascular, que é, pelo menos em parte, devido à indução preferencial de S1P3 através um receptor ativado de protease (PAR1) como resultado de uma proporção reduzida de proteína C ativada para trombina (Angus, D.C.,van der Poll, T. 2013).

Essa disfunção microvascular leva a alterações que desencadeiam uma perda de função dos órgãos, com hipoperfusão tecidual, que é agravada por vasodilatação, hipotensão e reduzida deformação das células vermelhas. Leva ainda ao desenvolvimento de insuficiência renal, e colapso circulatório, desempenhando um papel importante na fisiopatologia de síndromes infecciosas como a sepse (Darwish, I.,Liles, W.C. 2013).

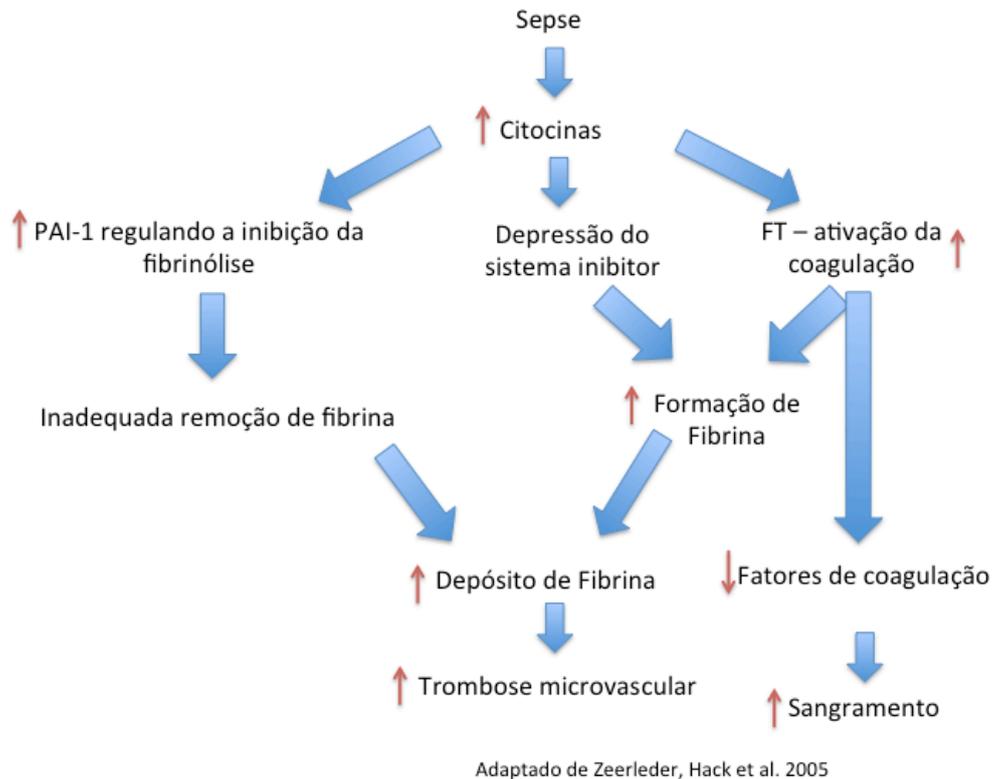


Figura 1.1: Alterações na coagulação durante a sepse.

1.4 - ENCEFALOPATIA ASSOCIADA À SEPSE (EAS)

O comprometimento cerebral é um dos primeiros sintomas originados pela sepse, denominado como encefalopatia associada a sepse (EAS). É caracterizada por uma deterioração dos estados mentais ou dos níveis de consciência, iniciado por um processo patológico extrínseco ao cérebro (Young, G.B., *et al.*, 1990). A EAS é uma complicação neurológica, associada com o aumento da mortalidade (de 16 a 73%) e da morbidade, que ocorre em mais de 70% dos pacientes com sepse grave, sendo a encefalopatia mais comum em UTIs e frequentemente é pouco diagnosticada (Bolton, C.F., *et al.*, 1993). A disfunção cerebral é caracterizada por um início agudo com comprometimento da função cognitiva, que pode variar entre lentidão do pensamento, falta de atenção, desorientação, agitação até torpor e coma (Sonneville, R., *et al.*, 2013).

A encefalopatia é observada em pacientes com infecções por bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos ou por causas não infecciosas, sugerindo que não é a infecção em si a responsável pelo seu desenvolvimento, mas as moléculas inflamatórias liberadas durante a SIRS (Jacob, A., *et al.*, 2011). Portanto, a característica principal para desenvolvimento da patologia é uma ação dos

mediadores inflamatórios no cérebro ou uma resposta citotóxica mediada por esses mediadores nas células cerebrais (Papadopoulos, M.C., *et al.*, 2000). Esse processo inflamatório altera múltiplos fatores (Figura 1.2), incluindo redução do fluxo sanguíneo cerebral, diminuição da oferta de oxigênio às células cerebrais, alteração na permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), edema cerebral e a ativação de células da micróglia em regiões como hipocampo. (Taccone, F.S., *et al.*, 2010).

Como resultado das variações de comportamento, mais de 60% dos casos de EAS foram relacionados com a perda da capacidade cognitiva de curta e longa duração (Berg, R.M., *et al.*, 2011). A performance cognitiva está descrita como permanecendo alterada em mais de 70% dos casos após um ano da cura da sepse. Além de falhas na formação e consolidação das memórias, também são observadas alterações no déficit de atenção, na velocidade de processamento e na função intelectual. Essas mudanças podem melhorar a longo prazo (Wilson, J.X., Young, G.B. 2003).

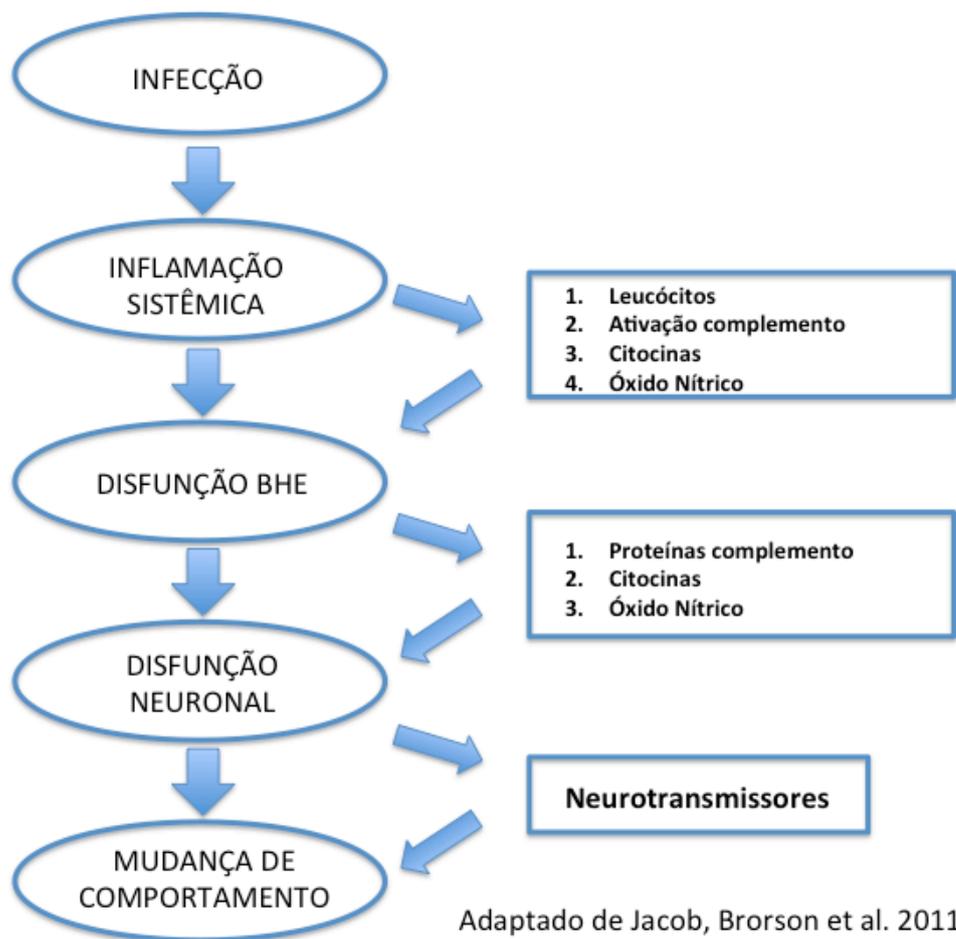


Figura 1.2: Representação do processo de infecção com alterações funcionais

1.5- FISIOPATOLOGIA DA EAS

1.5.1 – Alterações na Barreira Hematoencefálica, Ativação Endotelial e Disfunção da Microcirculação

A interface entre o SNC e o sistema circulatório constitui a barreira hematoencefálica (BHE) nos mamíferos. É formada por uma associação entre astrócitos, pericitos e células endoteliais, promovendo a homeostase do parênquima cerebral, regulando o fluxo sanguíneo capilar e atividade sináptica, criando um microambiente favorável ao funcionamento neuronal, papel esse que depende da integridade das células endoteliais da microcirculação no cérebro (Papadopoulos, M.C., *et al.*, 2000, Abbott, N.J., *et al.*, 2006). Durante a sepse ocorre ativação das células endoteliais, resultando na disfunção da BHE permitindo a entrada ou a estimulação da síntese e liberação de vários mediadores inflamatórios e moléculas tóxicas no cérebro, causando danos as células neuronais (Tsao, N., *et al.*, 2001).

As células endoteliais são mantidas unidas pelas junções oclusivas (*tight-junctions*), limitando a entrada de moléculas constituintes do plasma a interface sangue-cérebro e possuindo mecanismos de transporte na membrana que regulam a passagem de substâncias como nutrientes para o interior do tecido cerebral e o efluxo de toxinas e metabólitos. São vários os mecanismos que podem levar à ativação endotelial, culminando com o aumento da permeabilidade da BHE, durante a inflamação (Brown, R.C., *et al.*, 2007).

A ativação das células endoteliais cerebrais induzidas por LPS ou por endotoxinas bacterianas, leva ao aumento da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1) na microvasculatura durante a sepse, proporcionando maior adesão de leucócitos ativados, facilitando a entrada no tecido cerebral (Hofer, S., *et al.*, 2008). Esse processo leva a ativação da via de sinalização de I κ B- α /NF- κ B, gerando aumento na síntese de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , TNF- α , MCP-1 e IL-6 no tecido cerebral (Semmler, A., *et al.*, 2008). Tanto LPS quanto as citocinas induzem a expressão da iNOS nas células da glia, com aumento na síntese de NO (Sugaya, K., *et al.*, 1998). O NO tem um importante papel na eliminação dos patógenos, mas também pode levar ao estresse oxidativo nas células, pela interação com ânion superóxido, gerando mais peroxinitrito, potencializando a toxicidade (Miles, A.M., *et al.*, 1996), ativando e alterando a função das células do endotélio durante a sepse (Handa, O., *et al.*, 2008).

As alterações na BHE e a ativação das células endoteliais estão relacionadas com a redução do fluxo sanguíneo cerebral e o aumento da resistência vascular cerebral. A inibição de eNOS leva à vasoconstrição do leito microvascular e consequentemente à diminuição da perfusão tecidual cerebral (Wilson, J.X., Young, G.B. 2003). Ocorrem ainda alterações microcirculatórias cerebrais de forma aguda durante a sepse que, mesmo quando a hemodinâmica global ainda está mantida, já há evidência de hipoperfusão do tecido cerebral caracterizada pela diminuição da densidade capilar funcional da membrana *pia mater*. Esse distúrbio na microcirculação tem importante papel na fisiopatologia da EAS (Taccone, F.S., *et al.*, 2010).

1.5.2 Ativação Glial e Excitotoxicidade

O SNC possui, como base para a sustentação da homeostase celular, as células gliais, como astrócitos, oligodendrócitos e a microglia. Os astrócitos são células elétricas excitáveis neuronais que controlam o meio extracelular neuronal, incluindo entre suas funções a homeostasia metabólica, contribuem para formação da BHE e participam da reestruturação da integridade tecidual após o dano. As citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ , IL-2 e M-CSF) provocam a hipertrofia dos astrócitos (astroglíose) com aumento da expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (Eddleston, M., Mucke, L. 1993). Esse perfil molecular de proteção do ambiente celular neuronal também é favorecido pela liberação de fatores neurotróficos como fator de crescimento de neurônios (NGF), neurotrofinas (NT-3 e NT-4) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que estão envolvidos no metabolismo de aminoácidos excitotóxicos ou na via antioxidante, controlando os níveis de neurotoxinas (Eddleston, M., Mucke, L. 1993, Giulian, D. 1993).

As células da microglia são caracterizadas por monitorarem o ambiente externo, respondendo a sinais de desequilíbrios da homeostase através de atividades de suporte e proteção, salvaguardando os mecanismos de defesa inata ou para ajudar nas respostas imune específicas (Kreutzberg, G.W. 1996, Stoll, G., Jander, S. 1999). Em condições fisiológicas a microglia está presente em todas as regiões do cérebro, e intimamente associada com os neurônios e com os astrócitos. A microglia possui uma rápida capacidade de reagir a modificações que perturbam o ambiente neuronal por possuir sensores (receptores e canais iônicos)

que sinalizam modificações de fatores solúveis ou insolúveis indicando dano ou perigo (Hanisch, U.K. 2002).

Após a detecção do dano tecidual, as microglias, que são células altamente ramificadas e possuem uma grande motilidade, abandonam seu estado “inativo” ramificado e passam por uma mudança morfológica dramática para adotar um estado ameboide “ativado”, com um soma alargado e com processos dendríticos menos espessos (Kreutzberg, G.W. 1996, Streit, W.J., *et al.*, 2000). Quando ativada a microglia passa a desempenhar um potencial fagocítico, sendo capaz ainda de sintetizar e liberar citocinas e quimiocinas (IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8, MCP-1, MIP-2, RANTES, IL-10, TGF- β entre outras) (Hanisch, U.K. 2002). Além disso, a microglia também possui a capacidade de ser uma célula apresentadora de antígenos, bastante eficaz na estimulação de linfócitos (Neumann, H. 2001).

Em resposta a estímulos inflamatórios como na sepse, a microglia é uma das primeiras células a sofrer ativação em resposta as citocinas pró-inflamatórias circulantes. As citocinas IL-1 e TNF- α estão relacionadas com processos que levam a ativação da microglia e subsequentemente danos neuronais (Akrouf, N., *et al.*, 2009, Gabay, C., *et al.*, 1997, Rothwell, N.J. 1997). Durante a EAS ocorre uma elevada ativação da microglia, amplificando o processo neuroinflamatório com maior liberação de NO e citocinas pró-inflamatórias. Essa alteração promove modificações nos sistemas de neurotransmissões catecolaminérgica, gabaérgica, colinérgica e glutamatérgica (Adam, N., *et al.*, 2013).

Alterações nos níveis cerebrais de neurotransmissores têm um papel essencial na EAS. Déficits na função colinérgica está associado a delirium e dano cognitivo (Rothwell, N.J. 1997). Modelos experimentais de sepse demonstram altos níveis de aminoácidos precursores da síntese de neurotransmissores como triptofano (Freund, H.R., *et al.*, 1985). O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, não atravessando a BHE, mas sendo sintetizado localmente por neurônios e células da glia. O glutamato possui 4 tipos de receptores, sendo: 1) AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propriônico), 2) NMDA (N-metil-D-aspartato) 3) kainato (KA) os ionotrópicos e 4) os receptores metabotrópicos associados a proteína G (mGluRs₁₋₈) (Gasparini, C.F., Griffiths, L.R. 2013).

O glutamato em condições fisiológicas tem importante papel no desenvolvimento neuronal, na plasticidade sináptica e nos processos de aprendizado e memória. Os astrócitos ativados convertem o glutamato captado nas

sinapses em glutamina pela enzima glutamina sintetase. A glutamina armazenada é liberada e captada pelos neurônios, sendo convertida a glutamato pela glutaminase, num processo dependente de ATP (Nedergaard, M., *et al.*, 2002). Em resposta a estímulos inflamatórios como na EAS, é observado aumento da liberação pré-sináptica de glutamato, provocando morte celular e neurodegeneração via processo de excitotoxicidade (Miranda, A.S., *et al.*, 2010).

O papel da neurotoxicidade associada ao glutamato já foi intensamente estudado em diversas patologias neurológicas, desde isquemia aguda, malária a doenças neurodegenerativas (Kostic, M., *et al.*, 2013, Doble, A. 1999, Kostandy, B.B. 2012). A morte neuronal induzida por glutamato pode se dar por ativação de receptores NMDA levando à entrada excessiva na célula de Na^+ e Ca^+ e pela inibição da recaptação de cisteína, fatores esses que, em conjunto, levam ao estresse oxidativo (Wilson, J.X., Young, G.B. 2003). O glutamato diminui a reciclagem e transporte de ascorbato, que é um antioxidante, pelos astrócitos. As concentrações líquóricas e plasmáticas de ascorbato estão reduzidas em pacientes com EAS (Galley, H.F., *et al.*, 1996). Finalmente, a ativação da micróglia, observada consistentemente na sepse, também desencadeia a liberação maciça de glutamato, exacerbando ainda mais o quadro de excitotoxicidade. É importante ressaltar que a homeostase das células cerebrais depende de interações complexas entre neurônios e células da glia. A ativação da microglia, portanto, pode se tornar neuroprotetora ou neurotóxica (Hanisch, U.K. 2002).

1.5.3 – Estresse Oxidativo, Desequilíbrio Bioenergético e Disfunção Mitocondrial

A resposta inflamatória sistêmica é um fator determinante para o estresse oxidativo-nitrosativo, com a liberação de ROS e RNS, com o potencial de provocar danos ao sistema nervoso central (SNC). ROS/RNS induzem peroxidação lipídica, produzindo hidroperóxido lipídico (L-OOH), na vasculatura e no parênquima cerebral em razão de um desequilíbrio nos processos antioxidantes no cérebro. Essa peroxidação das cadeias lipídicas gera radicais livres, capazes de induzirem inflamação local, contribuindo com alteração na permeabilidade da BHE (Berg, R.M., *et al.*, 2011). Os radicais livres provocam também a diminuição da biodisponibilidade vascular de NO, e aumentam a indução de iNOS e hipóxia, associado com aumento

de peróxido de nitrito com consequente falha bioenergética neuronal (Doerschug, K.C., *et al.*, 2007).

O equilíbrio energético do cérebro depende da oferta de glicose e oxigênio (O_2). A manutenção da homeostase tecidual e a neurotransmissão, principalmente glutamatérgica, consomem a maior parte da energia gasta pelo cérebro. O metabolismo do glutamato tem papel essencial na manutenção dessa homeostase. A principal fonte energética do cérebro é originada pela glicose, tendo o cérebro diferentes tipos de transportadores de glicose (GLUTs): GLUT 1 localizado nos microvasos e células da glia e GLUT 3 é uma isoforma neuronal (Simpson, I.A., *et al.*, 2007). O suprimento cerebral de glicose necessita de um contínuo fluxo sanguíneo, o que durante a sepse é alterado. Contudo, o cérebro possui outras fontes alternativas de substratos energéticos como as fosfocreatinas, sintetizadas pelas enzimas creatino cinases, localizadas em áreas cerebrais com maior dispêndio de energia (Bozza, F.A., *et al.*, 2013).

Na neuroinflamação ocasionada pela sepse há aumento da atividade glutamatérgica excitatória e da utilização de glicose pelos astrócitos (Brown, A.M., Ransom, B.R. 2007). Com a liberação do glutamato no espaço extracelular, ocorre o aumento da atividade da bomba de Na^+/K^+ ATPase com co-transporte de sódio, normalizando o gradiente iônico através da membrana plasmática, via essa dependente de ATP. Assim, a neurotransmissão glutamatérgica na sepse aumenta e pode ser a causa e a consequência de uma falha energética, afetando diretamente a função cerebral (Bozza, F.A., *et al.*, 2013). Existe uma colaboração entre astrócitos e neurônios na defesa ao estresse oxidativo e na oferta de substrato. Sendo assim, os efeitos da neuroinflamação no metabolismo energético geram maior vulnerabilidade neuronal e neurodegeneração (Gavillet, M., *et al.*, 2008).

A disfunção mitocondrial tem papel essencial na patogênese de doenças agudas e crônicas cerebrais e está associada a EAS (Brealey, D., *et al.*, 2002). Há uma ineficiência no metabolismo mitocondrial com mudança no potencial de membrana e aumento do consumo de oxigênio relacionados à síntese de ATP. Em diferentes estruturas cerebrais há diminuição de atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, paralelamente à indução da creatina cinase em fase aguda da sepse (d'Avila, J.C., *et al.*, 2008). O dano na cadeia respiratória mitocondrial proporciona também uma rápida redução da atividade do complexo IV da cadeia transportadora de elétrons, reduzindo o consumo de O_2 e do conteúdo dos

citocromos mitocondriais cerebrais nas primeiras 24 horas após a indução da sepse (Barichello, T., *et al.*, 2006).

Além do papel no metabolismo energético, as mitocôndrias têm uma importante função na captação de cálcio nas células cerebrais. Alterações na atividade mitocondrial podem contribuir diretamente para o desarranjo na homeostase celular do cálcio, levando a neurodegeneração (Bozza, F.A., *et al.*, 2013). Alterações estruturais, nos lipídios e proteínas da membrana mitocondrial resultam na ativação da via de apoptose, são observadas na EAS. A cascata de apoptose celular é caracterizada pelo colapso do gradiente eletroquímico transmembrana paralisando a fosforilação oxidativa e liberando fatores proteicos que formam um complexo associado ao ATP para ativação de caspases 9 e 3, produzindo a morte celular neuronal (Kroemer, G., *et al.*, 1998).

1.6 - DISFUNÇÃO COGNITIVA

O processo de aprendizado é caracterizado pela aquisição de informações do ambiente. Essas informações dão origem às memórias através de um processamento para formação, consolidação e posterior evocação. A formação tem início no hipocampo e áreas próximas como córtex entorrinal e amígdalas basolaterais, pela ativação de receptores de glutamato do tipo AMPA que possibilitam a despolarização da célula com ativação em sequência dos receptores do tipo NMDA. A região do hipocampo é a que apresenta maior expressão dos receptores de glutamato AMPA, NMDA e os receptores metabotrópicos (Izquierdo, I., Medina, J.H. 1997). Ocorre a entrada de Ca^{+2} nas células piramidais, seguida pela ativação de várias proteínas quinases como as proteínas cálcio dependentes (PKC). Vias de fatores de transcrição são ativadas o que leva à síntese e liberação de glutamato e aumento da expressão de seus receptores (Izquierdo, I., McGaugh, J.L. 2000).

Existem evidências contundentes de que um terço ou mais de pacientes sobreviventes da sepse em unidade de terapia intensiva, demonstram processos crônicos de perda da capacidade cognitiva de longa duração, incluindo alterações na memória, perda de concentração e atenção (Hopkins, R.O., Jackson, J.C. 2006). O dano cognitivo pode ser irreversível e, em conjunto com uma inabilidade física, são responsáveis por aumento substancial nos custos financeiros com cuidados médicos

e limitações sociais, com redução da qualidade de vida dos acometidos (Iwashyna, T.J., *et al.*, 2010).

A disfunção cognitiva pode ser classificada como leve, moderada ou grave e pode limitar a habilidade de pensamento e raciocínio do indivíduo. O déficit cognitivo observado em pacientes que foram hospitalizados em UTIs, em função da sepse, não é equivalente ao associado a demências como na doença de Alzheimer e na demência vascular, as quais são tipicamente relacionadas à idade, de natureza progressiva e irreversível e sendo caracterizadas por significativos danos na memória em, pelo menos, uma esfera de atividade mental (Larson, E.B., *et al.*, 1992). Nos sobreviventes das UTIs, em alguns casos, a função cognitiva retorna a níveis fisiológicos em 1 ano após a saída do hospital. Entretanto, em até 46% dos sobreviventes, ocorre uma perda cognitiva considerável no primeiro ano, sem nenhuma melhora na capacidade cognitiva após o segundo ano de alta (Gordon, S.M., *et al.*, 2004).

Em um estudo recente, comparando pacientes que sobreviveram a uma internação em UTIs por sepse grave com outro grupo internado por outras causas, mostrou-se uma associação clínica e estatística significativamente aumentada de perda na função cognitiva de moderada a severa nos sobreviventes da sepse (Iwashyna, T.J., *et al.*, 2010). A longo prazo, a maioria dos pacientes mostrou uma melhora na função cognitiva total, porém algumas habilidades cognitivas, tais como a memória, não foram recuperadas completamente (Granja, C., *et al.*, 2005). Em estudo com modelo de ligadura e punção cecal (CLP) em ratos Wistar, foi observado que os animais tratados e recuperados da sepse apresentaram em testes de avaliação cognitiva alterações comportamentais, redução da formação de memórias de reconhecimento de objetos e sintomas depressivos associados (Barichello, T., *et al.*, 2007).

Foram identificadas duas hipóteses para o declínio cognitivo de longa duração: a primeira é uma hipótese neurodegenerativa, envolvendo a ativação da microglia e, a segunda, uma hipótese vascular, envolvida com danos ocasionados pelos processos isquêmicos difusos (Bozza, F.A., *et al.*, 2013). Os processos de memória e aprendizado são produzidos principalmente no hipocampo, e essa região cerebral apresenta uma alta densidade de receptores para IL-1, fazendo com que a região seja vulnerável durante o processo neuroinflamatório ocasionado pela sepse (Imamura, Y., *et al.*, 2011). O estímulo produzido por LPS aumenta a liberação de IL-1, que atinge níveis até 6 vezes maiores no hipocampo, e promovem uma maior

ativação da micróglia. Essa ativação inibe a neurogênese no hipocampo exacerbando o dano no processo de memória (Terrando, N., *et al.*, 2010).

O processo de consolidação das memórias perpassa por um evento eletrofisiológico conhecido como potenciação de longa duração (LTP). Nesse processo ocorre uma resposta persistente dos neurônios a uma repetida estimulação nas sinapses próximas à estimulada (Izquierdo, I., McGaugh, J.L. 2000). A produção da LTP antes da aquisição das mais variadas tarefas, como num esquivia inibitória em que o animal inibe uma resposta para não receber um estímulo aversivo, ou num labirinto aquático em que o animal precisa se localizar no ambiente para encontrar a saída, requer os mesmo processos bioquímicos para a consolidação das memórias (Clarke, J.R., *et al.*, 2010).

A diminuição na LTP foi observada em modelo experimental de sepse (CLP), com aumento da síntese de IL-1 e na expressão do receptor IL-1R, potencializando a ativação de micróglia. A interação de IL-1 com seu receptor está envolvida na EAS, indicando que a ativação de IL-1R inibe LTP no hipocampo. A LTP é necessária para consolidação da memória espacial durante o teste do labirinto aquático de Morris. O estímulo de LPS diminui o mecanismo de plasticidade sináptica, ou seja, a reorganização neuronal, culminando com a perda na aquisição da informação espacial na EAS (Imamura, Y., *et al.*, 2011).

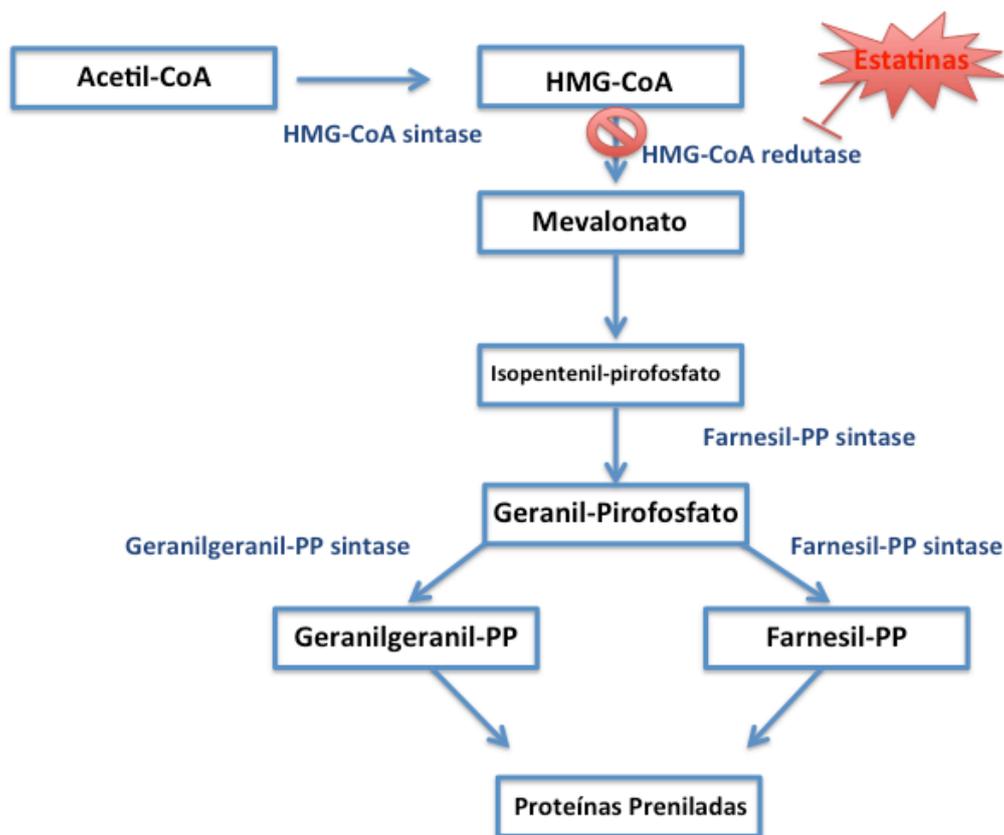
O dano cognitivo adquirido nos sobreviventes de UTIs causa danos cerebrais, e isso tem uma implicação importante na saúde pública, tanto para pacientes jovens quanto idosos. Não há tratamento específico para a EAS. A abordagem terapêutica tem, portanto, focado na causa da doença de base, a sepse grave ou o choque séptico, além de terapias de suporte para as disfunções orgânicas, correção de distúrbios metabólicos e suspensão de drogas com potencial neurotóxico. Assim, novas terapias que previnam ou tratem o dano cognitivo e os transtornos associados, podem evitar as sequelas originadas (Morandi, A., *et al.*, 2011).

1.7 - ESTATINAS

Os inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima-A redutase (HMG-CoA redutase), também conhecidos como estatinas, são fármacos utilizados na terapêutica das dislipidemias. O mecanismo de ação dessas drogas é a inibição da conversão da HMG-CoA em mevalonato, pela ligação competitiva à enzima HMG-CoA redutase, processo limitante para a biossíntese de colesterol endógeno (Figura 3) (Mans, R.A., *et al.*, 2010). A família das estatinas compreende drogas naturais

como lovastatina, mevastatina, pravastatina e sinvastatina e drogas sintéticas como fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina e rosuvastatina, as quais diferem entre si pela lipossolubilidade, meia-vida e potência (Greenwood, J., *et al.*, 2006).

Os intermediários metabólicos da cascata de síntese do colesterol, incluindo geranylgeranyl pirofosfato e farnesil pirofosfato, regulam modificações pós translacionais (prenilação) de uma variedade grande de proteínas, incluindo as GTPases Ras, Rho e Rac. Os membros da família Ras e Rho são conhecidos por servirem a funções específicas em termos de secreção, motilidade e proliferação celular. As estatinas causam a inibição da prenilação gerada por Ras e Rho, inibindo vias de transdução de sinais pela ativação de receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs). Os PPARs estão envolvidos com o controle da inflamação vascular e prevenindo a ligação dos fatores de transcrição como NFκB ao DNA, produzindo assim um efeito anti-inflamatório. Esses efeitos das estatinas são conhecidos como pleiotrópicos. (Walter, D.H., *et al.*, 2004).



Adaptado de Steffens and Mach 2004

Figura 1.3: Farmacodinâmica dos inibidores da HMG-CoA redutase

O potencial desses efeitos pleiotrópicos anti-inflamatórios podem ser uma importante ferramenta imunomodulatória, aumentando a função endotelial e reduzindo efeitos coagulantes. Esses efeitos podem ainda prevenir ou atenuar efeitos sobre o SNC, atuando sobre os mecanismos causais, incluindo neuroinflamação, dano a BHE, apoptose neuronal, isquemia e hemorragia, além de atuar sobre ativação da micróglia (Steffens, S., Mach, F. 2004). O tratamento de células gliais estimuladas por LPS com lovastatina inibiu a ativação, tanto de astrócitos quanto da micróglia (Pahan, K., *et al.*, 1997).

1.7.1 Efeitos pleitrópicos das Estatinas nas células endoteliais e coagulação

A disfunção endotelial gerada na sepse é um dos marcadores clínicos envolvidos com um mal prognóstico. As estatinas exercem efeitos benéficos específicos na modulação da função endotelial. A este respeito, as estatinas regulam a biodisponibilidade de NO derivado do endotélio, aumentando a expressão de eNOS. A expressão e ativação de eNOS modula o balanço redox, pela interferência com as ROS, como na reação direta de NO com radicais superóxidos. O NO pode ativar, assim, mecanismos de defesas antioxidantes nas células endoteliais. As estatinas podem, ainda, interferir na geração de ROS, reduzindo a formação de mieloperoxidase derivada da reação de oxidação do NO (Walter, D.H., *et al.*, 2004). As estatinas diminuem a expressão de iNOS, reduzindo, assim, a apoptose celular, preservando o fluxo sanguíneo vascular (Morandi, A., *et al.*, 2011).

As estatinas podem modular a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais. Este efeito em particular acontece sobre as selectinas (P) e (E), onde a regulação negativa de E-selectina é descrita como sendo mediada pela inibição de Rho e subsequentemente pela expressão gênica mediada por Rho. As estatinas reduzem ambas as expressões, constitutivas e induzidas, de ICAM1, a qual está diretamente envolvida com a sustentação tanto na adesão de leucócitos, quanto motilidade e migração (Eccles, K.A., *et al.*, 2008). A migração leucocitária, especialmente cruzando a barreira vascular, é dependente da expressão da metalloproteinase (MMP) para transpor a lâmina basal. As estatinas também inibem a secreção de MMP pelos leucócitos, especialmente monócitos/macrófagos (Greenwood, J., *et al.*, 2006).

A influência direta proporcionando a angiogênese é promovida pelas estatinas em regiões isquêmicas pelo estímulo de ação nos fatores de crescimento tecidual

1.7.2 Efeitos pleiotrópicos anti-inflamatórios das Estatinas na sepse

Em virtude dos seus efeitos pleiotrópicos anti-inflamatórios, as estatinas também surgiram como potencialmente úteis em cuidados a pacientes críticos que apresentam infecção bacteriana, como nas fases agudas da sepse e choque séptico, assim como no tratamento de infecções graves (Kouroumichakis, I., *et al.*, 2011). O estudo de meta-análise com 388 pacientes com infecção por bacilos gram-negativos ou por *Staphylococcus aureus*, mostrou que o tratamento com estatinas reduziu significativamente as taxas de mortalidade por ambas as formas de bacteremia (Liappis, A.P., *et al.*, 2001).

O efeito protetor durante infecções perpassa pelo potencial anti-inflamatório das estatinas. Pacientes que receberam estatinas têm menor probabilidade de desenvolvimento de sepse grave (Almog, Y. 2003). A atorvastatina demonstrou um efeito na sobrevivência de animais submetidos ao modelo de CLP, proporcionando uma redução nos níveis circulatórios de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e MCP-1/CCL2 e aumentou a atividade e sinalização da insulina, no tecido adiposo, músculos e fígado. Em paralelo, houve um decréscimo nas vias de sinalização pró-inflamatórias de TLR4-NF κ B e redução da regulação da atividade da via de fosforilação da c-Jun N-terminal kinase (JNK kinase) (Calisto, K.L., *et al.*, 2010). As estatinas podem, ainda, ter efeitos imunomoduladores, onde inibem as respostas do tipo Th1 (IL-2, IL-12, INF- γ , TNF- α) e suprarregulam a resposta do tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β) (Steffens, S., Mach, F. 2004).

Os efeitos anti-inflamatórios das estatinas são promissores no controle da neuroinflamação e dos danos causados por esse processo. Trabalhos recentes verificaram que as estatinas reduzem a ativação da micróglia quiescente e aumentam a resposta reflexa anti-inflamatória colinérgica, via nervo vago. A lovastatina foi descrita como inibidora da expressão de CD40 (marcador de ativação de micróglia) em cultura de células de micróglia, bloqueando indiretamente a expressão de moléculas pró-inflamatórias. Além disso a lovastatina induziu significativamente a capacidade de fagocitose da micróglia, um indicador desse fenótipo anti-inflamatório (Morandi, A., *et al.*, 2011).

1.7.3 Estatinas e dano cognitivo

Os efeitos benéficos sobre a homeostase neuronal no controle da neuroinflamação e na neurotoxicidade tem proporcionado evidências emergentes de que as estatinas possam participar como reguladoras do processo de disfunção cognitiva. Em modelo animal da doença de Alzheimer a sinvastatina, em concentração clínica, aumentou a capacidade de aprendizado e formação de memória, com indução de LTP, via fosforilação por Akt, no hipocampo (regiões CA1 e CA3) em magnitude maior para memória de longa duração (Mans, R.A., *et al.*, 2010). A atorvastatina e a pitavastatina reduziram o número de placas amiloides em animais, preservando as células neuronais e proporcionaram a manutenção da função cognitiva (Kurata, T., *et al.*, 2011).

Como descrito anteriormente as estatinas podem modular o processo de angiogênese. Além disso a sinvastatina e a atorvastatina produziram neurogênese em áreas do hipocampo (giro denteado) e sinaptogênese, com redução da morte neuronal na região CA3 do hipocampo em modelo animal de dano cerebral traumático (Lu, D., *et al.*, 2007).

Portanto, como verificado na literatura, os efeitos pleiotrópicos anti-inflamatórios, anticoagulantes, imunomoduladores e neuroprotetores das estatinas sugerem um possível emprego em doenças inflamatórias não-infecciosas ou infecciosas, como na sepse e na encefalopatia associada a sepse EAS. Na EAS as estatinas poderiam participar do processo de proteção neuronal, inibindo os efeitos dos mediadores inflamatórios no SNC, o que pode levar a redução ou até mesmo a reversão do dano ao processo cognitivo produzido pela disfunção inflamatória cerebral.

2 - OBJETIVOS

Esta tese tem como objetivo principal padronizar o modelo de sepse para avaliação do dano cognitivo e investigar o potencial terapêutico das estatinas na encefalopatia associada a sepse e suas sequelas.

Entre os objetivos específicos, cabe destacar:

- Padronizar o modelo de injeção intraperitoneal de sobrenadante cecal como modelo experimental de sepse;
- Analisar sobrevida e o escore clínico no modelo de injeção intraperitoneal de sobrenadante cecal
- Caracterizar o dano cognitivo em animais que sobrevivem a sepse;
- Analisar o efeito das estatinas na sobrevida e no escore clínico no modelo de injeção intraperitoneal de sobrenadante cecal;
- Caracterizar o efeito das estatinas sobre a neuroinflamação presente na sepse, quanto aos níveis de citocinas, ativação microglial, estresse oxidativo e MPO;
- Testar a eficácia das estatinas (atorvastatina e sinvastatina) na prevenção do dano cerebral decorrente da sepse;

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss Webster machos pesando 20-30 g provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ. Durante a permanência dos animais em nosso biotério, estes foram mantidos em temperatura constante (25°C), com ciclo de 12 h claro/escuro e livre acesso de água e comida. O Comitê de ética no uso de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA / FIOCRUZ), sob licença número L033/09 aprovou as experiências nestes estudos.

3.2 Modelo sepse por injeção do sobrenadante Cecal (ISC)

Camundongos Swiss Webster foram pesados, sendo realizado o cálculo da média de peso geral dos animais e calculado a quantidade de conteúdo cecal a ser coletado para administrarmos uma dose de 5mg/g de peso corporal. Um grupo de animais foi eutanasiado e o conteúdo cecal da região do ceco foi coletado em cada camundongo. Posteriormente esse conteúdo cecal foi diluído e macerado em salina estéril, e foi então centrifugado a 1100 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e foi realizada uma diluição em série para leitura em 660 nm em leitora de microplaca com a finalidade de quantificar o *pool* de bactérias contido no macerado. Com essa quantificação foi padronizado o número de bactérias necessário para reproduzir a sepse nos animais. Do ponto que obtivemos uma densidade óptica (DO) próximo a 0,8 (pico de crescimento bacteriano), realizamos uma diluição de 1000x e foram plaqueados 10 µL em placa de cultura contendo meio Tryptic Soy Agar (TSA), para quantificarmos o número de unidades formadoras de colônias (UFC) na DO obtida. Em seguida, os animais foram divididos em 4 grupos (figura 3.1), sendo salina como grupo controle onde os animais receberam 0,5 mL de solução salina por via i.p. Os outros três grupos receberam injeção do sobrenadante cecal (ISC) 0,5 mL, por via i.p., e foram classificados em grupo ISC sem tratamento (ST), e os grupos que receberam o tratamento com estatinas foram classificados em ISC + Ator. (tratamento com atorvastatina, 20 mg/kg de peso corporal por v.o.) e ISC + Sinv. (tratamento com sinvastatina, 20 mg/kg de peso corporal por v.o.). Após 6 h, os quatro grupos de animais receberam 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%), para controle da volemia e receberam antibioticoterapia por via s.c., uma vez ao dia durante 2 dias consecutivos, com um antibiótico de largo espectro do grupo dos betalactâmicos, (imipenem 30 mg/kg de peso corporal). Os animais dos grupos ISC

tratados receberam o tratamento com as estatinas 1 h antes da administração do macerado e 3 doses após injeção do sobrenadante, concomitantemente, com a antibioticoterapia. Os animais foram acompanhados para análise de mortalidade e examinados no dia 15 pós-infecção para avaliação da função cognitiva.

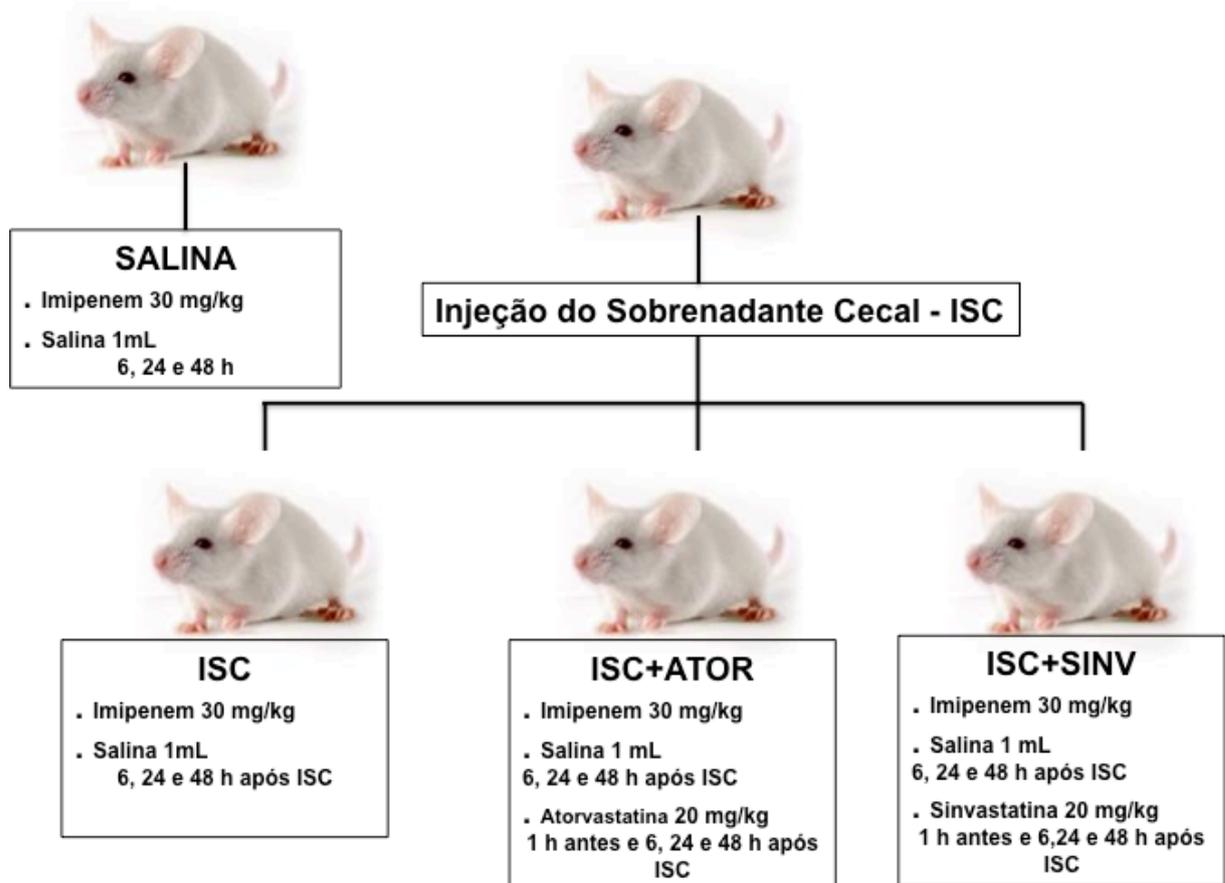


Figura 3.1: Grupos utilizados no desenvolvimento do presente estudo

3.3 Avaliação de escore clínico

Entre 6 h e até 48 h após a infecção, foram avaliados parâmetros afim de se quantificar a gravidade da sepse. Nesta avaliação, a maior pontuação se correlaciona com aumento da gravidade. Os camundongos foram avaliados com base nas seguintes variáveis (quadro 3.1): piloereção, abdomen contraído, alterações de locomoção, frequência respiratória, lacrimação, fechamento de pálpebras, força ao agarrar, tônus corporal, temperatura corporal, o interesse pelo ambiente, perda da atividade motora e alterações nas fezes. Quando verificado alteração em algum dos parâmetros citados anteriormente, foi acrescentado 1 ponto,

por alteração. Após análise, foram totalizados os pontos e desta forma foi determinada a gravidade da doença de acordo com a tabela 3.1.

Quadro 3.1: Escore Clínico definido por 12 parâmetros a fim de estabelecer gravidade da sepse

Parâmetros
Pilorereção
Abdômen contraído
Alterações de fezes
Tônus Corporal
Lacrimação
Fechamento de Pálpebras
Atividade Locomotora
Alteração de temperatura Corporal
Alerta (escape ao toque)
Interesse pelo ambiente
Força ao Agarrar
Taxa de Respiração

Tabela 3.1: Pontuação que estabelece a gravidade da sepse

Total	Grau
0	Sadio
1-4	Sepse leve
5-8	Sepse moderada
9-12	Sepse Grave

3.4 Coleta das amostras de soro e cérebro dos animais

Os camundongos Swiss Webster foram anestesiados por via inalatória com Isoflurano, e foi realizada punção cardíaca com agulha de 21G e seringa de 1 mL para coleta de sangue. O sangue foi armazenado em microtubos de 1,5 mL e foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. O soro foi coletado e as amostras foram guardadas em freezer -80°C. Em seguida a coleta de sangue, foi realizada perfusão em salina estéril, com um pequeno corte no átrio direito para o extravasamento do sangue restante. Logo após, foi realizada abertura do crânio com remoção do cérebro dos animais. Os cérebros foram divididos em 2 partes na linha medial e foram acondicionados em criotubos e armazenados a - 80°C. As amostras de soro e cérebro foram coletadas nos tempos de 6 h e 24 h após injeção do macerado cecal.

3.5 Microscopia Intravital

Para a visualização da microcirculação cerebral em 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal, controle salina, ISC, ISC tratados com sinvastatina ou atorvastatina, foram anestesiados com uma solução de xilasina (10 mg/kg de peso corporal) e quetamina (100 mg/kg de peso corporal) e a veia caudal foi puncionada para administração de marcadores fluorescentes. Foi realizada uma craniotomia no osso parietal direito com o auxílio de uma broca, permitindo a exposição da membrana *pia mater* (Araujo, C.V., *et al.*, 2012). Esta janela craniana permite a observação dos vasos sanguíneos desta rede vascular que ficará sob o feixe de luz (Svoboda, K., *et al.*, 1997, Carvalho-Tavares, J., *et al.*, 2000). O campo observado foi continuamente mantido sob superfusão com líquido cefalorraquidiano artificial a 37°C e pH 7,35. Este superfusato foi continuamente areado com 10% O₂, 6% CO₂ e 84% N₂, mantendo desta forma as condições de tensão gasosa e pH comparáveis as fisiológicas, evitando assim qualquer processo inflamatório local.

Após a administração por via i.v. de fluoresceína dextran (FITC-dextran 150), as imagens da microcirculação foram adquiridas através do software Archimed 3.7.0 (Microvision, France). A contagem de capilares foi feita com o auxílio do software Saisam 5.1.3 (Microvision, France) (Sabino et al, 2008). Foram feitas imagens seriadas com oculares de 10x e objetivas de 10x (Olympus BX150WI, NY, U.S.A.) com duração de 1 minuto para cada campo e calculado o número de capilares por mm². Somente foram computados os capilares continuamente perfundidos (densidade capilar funcional média). Para marcação dos leucócitos circulantes, foi feita a administração via i.v. de 0,3 mg/kg de rodamina 6G e os leucócitos com a

fluorescência associada foram visualizados através da microscopia descrita acima. A interação leucócito-endotélio foi avaliada determinando o número de leucócitos aderidos ao longo de 100 μm da parede venular por um período de 30 segundos. O rolamento de leucócitos foi definido quando células brancas se moveram dentro do vaso em velocidade inferior aos eritrócitos circulantes. Foram analisados vasos da membrana *pia mater* com diâmetros variando de 30 a 80 μm e a adesão leucocitária foi expressa em número de células/min/100 μm .

3.6 Atividade de Mieloperoxidase (MPO) cerebral

A presença de neutrófilos no cérebro foi medida indiretamente através da quantificação atividade da enzima MPO. As amostras de cérebros coletadas foram pesadas e posteriormente foram homogeneizadas (50 mg/ml) em PBS - tampão fosfato (em g/L: 240 mg de KH_2PO_4 , 8 g de NaCl, 144 mg de Na_2HPO_4 e 200 mg de KCl, pH 7,4) com EDTA (1 mM) e brometo de cetildimetilamônio (HTAB) a 0,5% e centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min a 4° C. O sobrenadante foi coletado e re-centrifugado a 1200 rpm por 15 minutos. Foram coletados 50 μL de sobrenadante e adicionado a 50 μL de solução de o-dianisidina (1 tablete de 10 mg de o-dianisidina e 14,7 mL de água milli-q) e foram incubados a 37°C por 15 minutos em estufa e foi posteriormente adicionado peróxido de hidrogênio 0,006% (H_2O_2). A solução foi incubada por mais 10 minutos. Atividade de MPO foi medida em leitora de microplaca (Spectra Max) a 460 nm a 37° C.

3.7 Imunohistoquímica

Para realização do procedimento de imunohistoquímica no tempo de 6 h os animais foram perfundidos com salina estéril e com solução tamponada de paraformaldeído a 4%, os cérebros foram extraídos da caixa craniana e armazenados em solução tamponada de paraformaldeído 4%. Em seguida, os cérebros foram fixados por um dia, com sacarose 30% em PBS e seccionados em criostato (40 μm). As seções foram lavadas em solução de bloqueio (soro normal de cabra a 10%, em solução salina tamponada com fosfato contendo 0,15% de Triton X-100) durante 2 h à temperatura ambiente. As seções foram incubadas com o anticorpo primário de coelho anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1), proteína ligadora de íons cálcio altamente expressa em macrófagos e microglia ativadas, (1:200) em agitação a temperatura ambiente *overnight*. Após lavar em

PBS, as seções foram incubadas com o anticorpo secundário de cabra Alexa 488 anti- IgG de coelho (1:1000) em tampão de bloqueio durante duas horas. As lâminas foram montadas com meio de montagem (Vectashield) com DAPI e fotografadas com um microscópio confocal (objetiva 60x). A quantificação da marcação foi realizada no programa ImageJ.

3.8 Dosagem de citocinas e quimiocinas

O tecido cerebral e o soro congelados foram usados para análise de citocinas e quimiocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e KC) por ELISA utilizando duo set kit (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Os cérebros foram homogeneizados em tampão contendo: PBS 1x, triton 0,1% e inibidor de protease (50 mM - Roche AG, Basileia, Suíça) e, em seguida, centrifugada (4750 rpm a 4°C durante 20 min). O sobrenadante foi recolhido e foi realizada quantificação de proteína (diluição 10x - 10 μ L da amostra/ 90 μ L de PBS 1x) pelo kit de ensaio de proteína BCA da Pierce (Thermo Scientific, EUA) (10 μ L da amostra em 190 μ L do reagente de trabalho, com uma curva padrão de albumina 2 mg/ml – leitura feita 562 nm) a leitura do ELISA foi realizada em 450 nm na leitora de microplacas e a quantidade de citocinas foi normalizada pela quantificação de proteínas.

3.9 Avaliação da peroxidação lipídica pela reação ao ácido tiobarbitúrico

Para caracterização do estresse oxidativo no cérebro dos camundongos Swiss Webster quantificamos a peroxidação lipídica pela reação ao ácido tiobarbitúrico - TBARS. Os cérebros foram homogeneizados em PBS (pH 7,4), contendo BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol) 0,2%. Foi realizada quantificação de proteína (diluição 10x - 10 μ L da amostra/ 90 μ L de PBS) pelo kit de ensaio de proteína BCA da Pierce (Thermo Scientific, EUA) conforme descrito anteriormente. Após a quantificação de proteína foram feitos cálculos do quanto de cada amostra seria utilizada por cada 100 μ g de proteína. As amostras foram diluídas em PBS-BHT totalizando (0,5 mL) e foram misturados com igual volume de ácido tiobarbitúrico a 0,67% (Sigma Chemical, EUA). Em seguida, a mistura foi aquecida a 100° C durante 60 min. As amostras foram colocados no gelo para a parada da reação. Foram aplicados 200 μ L da solução em placas de 96 poços de fundo chato e a absorvância foi determinada em 535 nm na leitora de microplaca. Os resultados foram expressos como malondialdeído (MDA, $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.10 Avaliação da integridade da barreira hematoencefálica

Os animais sofreram administração por via i.v. de 0,2 ml de corante azul de Evans 1% (Sigma) 6 h após injeção do sobrenadante cecal e foram sacrificados 1 hora depois. Foi realizada perfusão com salina (NaCl 0,9%) e os cérebros foram pesados e posteriormente colocados em formamida (1 mL, 37°C, 24h) para extração do corante aderido ao tecido. A absorvância do sobrenadante foi medida a 620 nm em leitora de placa. A concentração do corante azul de Evans foi calculada usando curva padrão. Os dados estão expressos em densidade óptica (DO) por mg de tecido.

3.11 Teste de Esquiva Inibitória

O teste de esquiva inibidora foi realizado no 15º dia após a infecção, para avaliar danos na capacidade cognitiva associada a memória aversiva. Esse processo mnemônico está relacionado com o sistema límbico, envolvendo regiões como hipocampo e amígdala basolateral. No ensaio os animais passam por um treino na caixa de esquiva passiva (Insight) que contém uma plataforma com 200 mm x 75 mm, chão em barras de aço inoxidável com espaçamento de 12,5mm. Na sessão treino os animais foram colocados sobre a plataforma e a sua latência para descer sobre as barras no chão com as quatro patas foi medida com um cronômetro. Imediatamente após deixar a plataforma, os animais receberam um choque de 0,6 mA, por 3,0 segundos. Após 1 h e 30 min da sessão treino os animais voltam a caixa, e o tempo de retenção sobre a plataforma é registrado, permitindo a avaliação da memória de curta duração (*Short-term memory* - STM). Isso se repete 24 h após o treino para avaliação da memória de longa duração (*Long-term memory* – LTM). O tempo máximo de permanência na plataforma é de 180 segundos.

3.12 Teste do labirinto aquático de Morris

O teste labirinto aquático de Morris foi realizado a partir do 15º dia após a injeção do sobrenadante cecal, para avaliar os danos na capacidade cognitiva associada a memória espacial. Esse tipo de memória (originada no lobo temporal medial, na região do hipocampo) permite a formação de um mapa cognitivo do espaço externo ao qual o animal se encontra e através do qual lhe permitirá melhor interação com o ambiente. No ensaio os animais foram treinados por 4 dias na piscina com diâmetro de 1,04 m e com altura de 55 cm. A piscina foi dividida em 4 quadrantes, sendo que no quadrante noroeste foi colocada uma plataforma de

acrílico com as dimensões de (13x30x13 cm) submersa. Foram colocadas figuras geométricas distintas em 3 lados da piscina. Os animais tiveram 60 segundos para tentar encontrar a plataforma ao longo dos 4 dias. O tempo de latência foi anotado. No quinto e último dia a plataforma foi retirada e foi anotado o tempo gasto pelos camundongos no quadrante em que se encontrava a plataforma durante 60 segundos.

3.13 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm SEM. Dados de esquia inibitória foram analisados com ANOVA seguido por post-hoc teste de Tukey e T de Student's e ou teste U de Mann-Whitney (sessão teste). A significância estatística das curvas de sobrevida foi avaliada pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). Dados de microscopia intravital foram analisados por análise de variância com o teste de Bonferroni e relatados como média \pm SEM. As diferenças nos níveis de citocinas/quimiocinas, MDA e mieloperoxidase foram avaliados pelos testes de ANOVA seguido por post-hoc teste de Tukey, Mann-Whitney ou t de Student's. Os parâmetros do escore clínico e mortalidade foram avaliados através da correlação de Pearson, afim de medir o grau de linearidade entre as variáveis. Os valores de $p \leq 0,05$, foram tomados como significância estatística.

4- RESULTADOS

4.1 Padronização do Modelo

A quantificação do número de unidades formadoras de colônias bacterianas foi realizada após a obtenção do sobrenadante do macerado cecal e verificou-se que havia aproximadamente 4×10^9 UFC/ml. Como cada animal recebe 0,5 ml do sobrenadante cecal, calculamos que a quantidade de bactérias administrada foi de 2×10^9 UFC por animal.

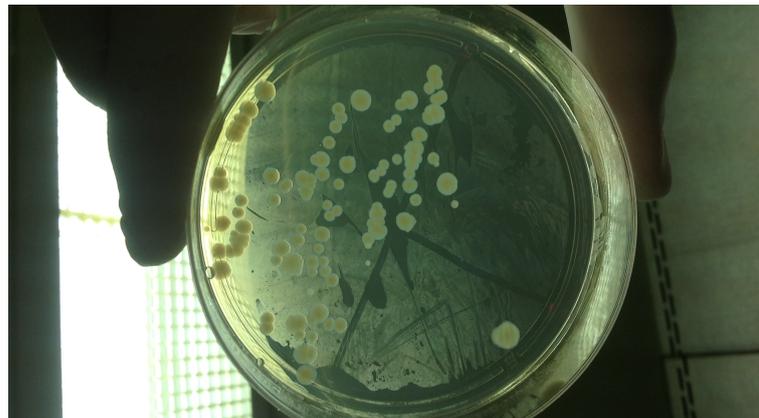


Figura 4.1: Quantificação de UFC no sobrenadante do macerado cecal. O sobrenadante cecal foi diluído 1000x e plaqueado (10 μ L) em TSA para quantificação de UFC/ml. Foram calculadas 4×10^9 UFC/ml e como o volume injetado é de 0,5 ml cada animal recebeu 2×10^9 UFC.

4.2 Análise de sobrevida

Na figura 4.2 observamos que não houve mortalidade nos animais ISC (n=14) 6 h após administração do sobrenadante cecal. Verificamos que em 24 h os animais ISC tiveram 30% de taxa de mortalidade e uma taxa de 50% até 48h após injeção do sobrenadante cecal. Não foi observado nenhuma mortalidade entre 48 h e 96 h. Podemos observar que os animais do grupo ISC apresentaram um aumento significativa (* $p < 0,05$ pelo teste de Log-rank) do percentual de sobrevida, quando comparados aos animais do grupo controle. Não ocorreu mortalidade nos animais do grupo salina ao longo das 96 h.

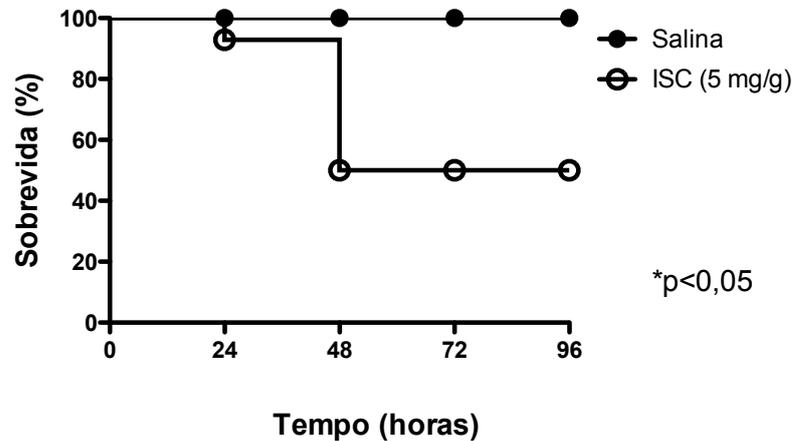


Figura 4.2: Análise de sobrevivência durante 96 h após a injeção do macerado cecal ISC. Animais Swiss Webster foram submetidos à ISC (dose 5 mg/g de p.c.) e tratados com antibiótico Imipenem (30 mg/kg p.c.) e reposição volêmica (NaCl 0,9%, 1 mL s.c.) durante 6, 24 e 48 h (n=14). Os animais inoculados com salina serviram como controle e também receberam reposição volêmica e Imipenem. * $p < 0,05$ pelo teste Log-rank (Mantel-Cox).

4.3 Escore Clínico

Foi avaliado o escore clínico nos camundongos do grupo ISC (n=14), através dos parâmetros característicos do quadro infeccioso. Na figura 4.3, constatamos uma piora significativa dos animais do grupo ISC em 24 h quando comparados a 6 h após administração do sobrenadante cecal, sendo observada uma melhora significativa do quadro em 48 h. O escore do grupo salina permaneceu sempre zero durante as 48 h.

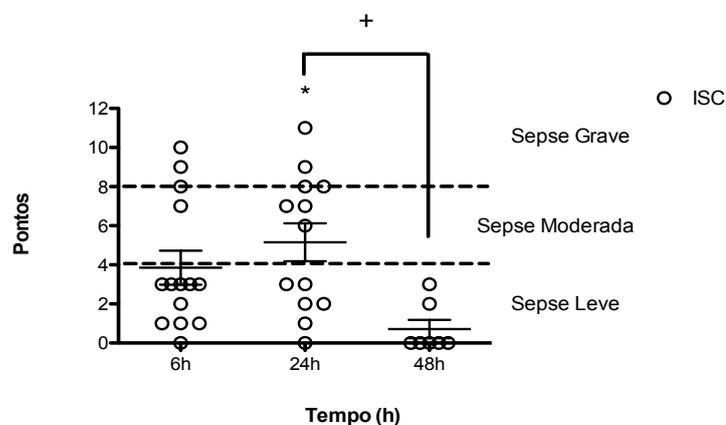


Figura 4.3: Quantificação e qualificação da gravidade da sepse. As análises comportamentais foram realizadas em animais do grupo ISC (n=14) em 6, 24 e 48 h após injeção do sobrenadante cecal, determinando a gravidade da sepse nos camundongos. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ pelo teste ANOVA post-hoc teste de Tukey.

4.4 Correlação entre Escore e Mortalidade

Para avaliarmos se existiria alguma associação linear entre os parâmetros do escore clínico e a mortalidade dos animais, realizamos uma correlação de Pearson. Utilizamos para essa análise animais ISC (n=31/ 6 h e n=28/ 24 h) nos quais foram aplicados o escore clínico. Observamos na tabela 4.1 que 6 h após injeção do sobrenadante cecal, os animais que possuíam comprometimento da atividade locomotora (n=17/ 55%) apresentaram uma forte correlação com a mortalidade (r=0,77; IC 95% (0,57 – 0,88); p valor <0,0001). Na tabela 4.2 observamos que 24 h após injeção do sobrenadante cecal, os animais que apresentaram perda de tônus corporal (n=12/ 43%) (r=0,85; IC 95% (0,71-0,93); p valor <0,0001) e alteração da frequência respiratória (n=10/ 36%) (r=0,71; IC 95% (0,46-0,85); p valor <0,0001) mostraram uma forte correlação com a mortalidade. Observamos ainda uma forte correlação entre um aumento no escore de gravidade e a mortalidade 24 h após injeção do sobrenadante cecal (n=28) (r=0,82; IC 95% (0,64-0,91); p valor <0,0001).

Tabela 4.1: Correlação entre o escore clínico e a estimativa de mortalidade nos animais 6 h após a injeção do sobrenadante cecal.

Parâmetros, n(%)	n = 31	Pearson r	(IC 95%)	p valor
Piloereção	25 (80%)	0,42	(0.07-0.67)	0,02
Abdômen Contraído	22 (71%)	0,54	(0.23-0.75)	0,002
Alteração de Fezes	18 (58%)	0,06	(-0.30-0.40)	0,75
Tônus Corporal	17 (55%)	0,51	(0.19-0.73)	0,004
Lacrimação	10 (32%)	0,53	(0.21-0.74)	0,002
Fechamento de Pálpebra	7(22%)	0,32	(-0.036-0.61)	0,08
Atividade Locomotora	17 (55%)	0,77	(0.57-0.88)	< 0.0001
Alteração da Temperatura Corporal	0			
Alerta (escape ao toque)	12 (39%)	0,40	(0.05-0.66)	0,03
Interesse pelo ambiente	15 (48%)	0,49	(0.16-0.72)	0,01
Força ao agarrar	18 (58%)	0,46	(0.12-0.70)	0,01
Taxa de Respiração	12 (39%)	0,53	(0.22-0.75)	0,002
Escore Total		0,58	(0.28-0.77)	0,0006

Os dados são expressos em número (%); forte correlação $0,7 < r < 1$, moderada correlação $0,3 < r < 0,7$, fraca correlação $r < 0,3$; p valor significativo com $p < 0,05$

Tabela 4.2: Correlação entre o escore clínico e a estimativa de mortalidade nos animais 24 h após a injeção do sobrenadante cecal.

Parâmetros, n(%)	n = 28	Pearson r	(IC 95%)	p valor
Piloereção	27 (96%)	0,17	(-0.22-0.51)	0,40
Abdômen Contraído	20 (71%)	0,39	(0.02-0.66)	0,04
Alteração de Fezes	11 (39%)	0,34	(-0.04-0.63)	0,08
Tônus Corporal	12 (43%)	0,85	(0.71-0.93)	< 0.0001
Lacrimação	7 (25%)	0,67	(0.39-0.83)	0,0001
Fechamento de Pálpebra	6 (21%)	0,60	(0.30-0.80)	0,001
Atividade Locomotora	14 (50%)	0,58	(0.26-0.78)	0,001
Alteração da Temperatura Corporal	6 (21%)	0,25	(-0.13-0.57)	0,20
Alerta (escape ao toque)	6 (21%)	0,60	(0.30-0.80)	0,001
Interesse pelo ambiente	10 (36%)	0,41	(0.04-0.68)	0,03
Força ao agarrar	14 (50%)	0,58	(0.26-0.78)	0,001
Taxa de Respiração	10 (36%)	0,71	(0.46-0.85)	< 0.0001
Escore Total		0,82	(0.64-0.91)	< 0.0001

Os dados são expressos em número (%); forte correlação $0,7 < r < 1$, moderada correlação $0,3 < r < 0,7$, fraca correlação $r < 0,3$; p valor significativo com $p < 0,05$

4.5 Caracterização do Dano Cognitivo

Os animais Swiss Webster foram submetidos a teste de dano cognitivo para avaliação de perda de memória aversiva: a esquiva inibitória 15 dias após a administração intraperitoneal do sobrenadante cecal (Zinn, C.G., *et al.*, 2009).

Os animais Swiss Webster divididos em grupo controle salina (n=8) e grupo ISC (n=8) realizaram uma sessão treino para posterior realização das sessões teste. Na figura 4.4A observamos que uma hora e meia após a sessão treino (STM), os animais do grupo ISC permaneceram menos tempo sobre a plataforma quando comparados ao grupo salina. Após 24 h (LTM), observamos que o tempo de permanência na plataforma do grupo ISC continuou menor quando comparado ao grupo salina (Figura 4.4B).

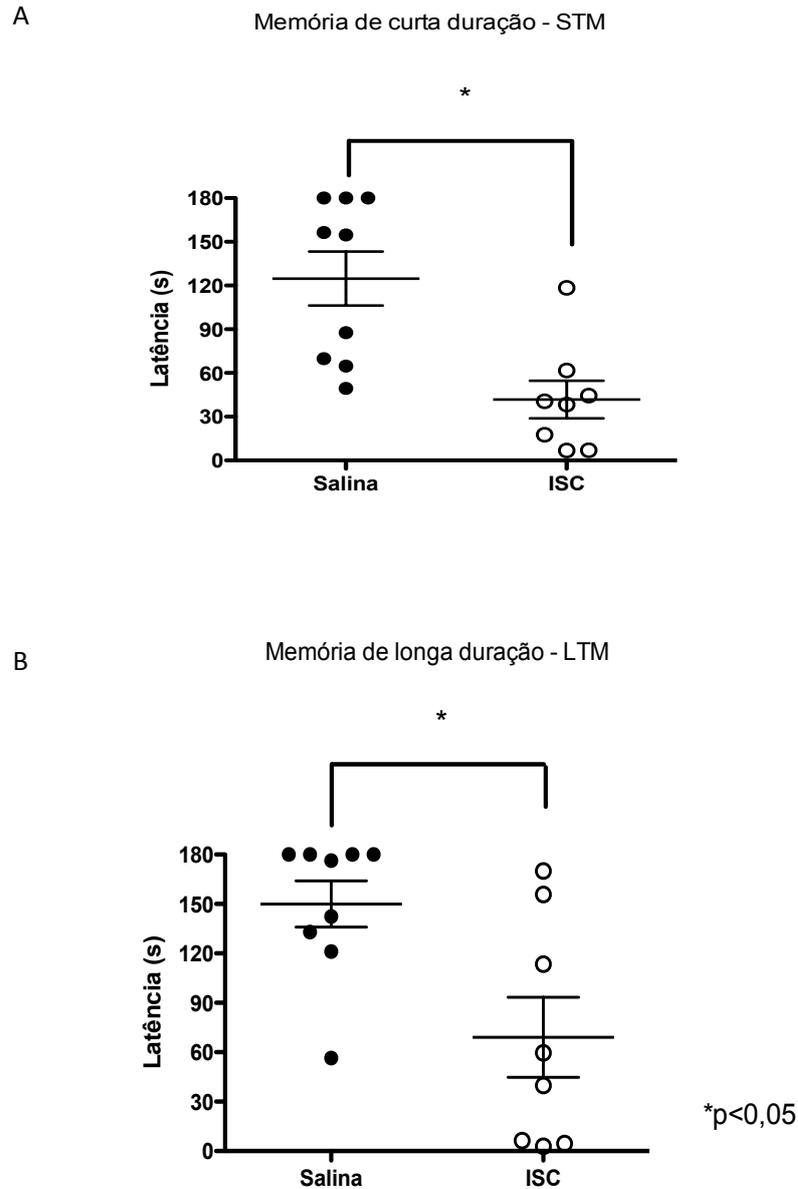


Figura 4.4. Caracterização do dano cognitivo pelo teste de esquila inibitória em animais estimulados com ISC. Os animais receberam ISC. (A) No 15º dia os animais foram submetidos à sessão de teste e o tempo de latência sobre a plataforma foi registrado e imediatamente após descerem da plataforma receberam um choque. (B) 24 horas após o treino a memória aversiva foi testada, com registro do tempo de latência na plataforma (com um *cut-off* de 180 seg.) * p<0,05 ou menos em relação ao grupo pareado. Os dados foram em valores individuais em média ± desvio padrão. (*p<0.05, Mann-Whitney U test).

4.6 Análise do papel das estatinas sobre a mortalidade no modelo de ISC

Com objetivo de buscar novas terapias para diminuir os danos no processo de memória e aprendizado, começamos a tratar os animais submetidos a ISC com estatinas, sendo a sinvastatina e a atorvastatina as drogas utilizadas.

A figura 4.5 apresenta o efeito do tratamento com as estatinas na sobrevida dos animais ISC. Entre os animais ISC não tratados, observamos uma taxa de mortalidade significativamente maior (62%) até 48 h em comparação ao grupo controle. Não foi observado nenhum óbito após 48 h. Não ocorreu mortalidade após 96 h. O tratamento com as estatinas não conferiu proteção a mortalidade causada pela sepse no modelo de injeção do sobrenadante cecal (Figura 4.5).

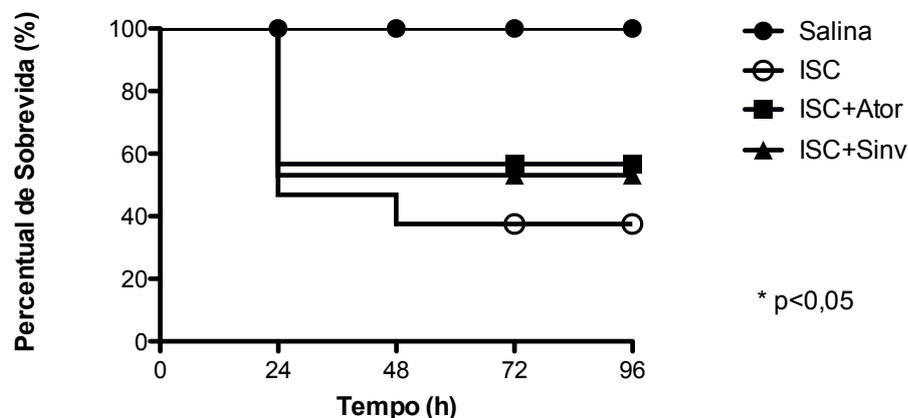


Figura 4.5: Efeito das estatinas sobre curva de sobrevivência após ISC Os animais receberam injeção de sobrenadante cecal ISC (n=34) e foram tratados com atorvastatina (ISC+Ator, n=37) ou sinvastatina (ISC+Sinv, n=37). Grupo controle salina (n=30). Os animais receberam antibioticoterapia (Imipenem 30 mg/kg p.c., s.c.) 6, 24 e 48 h após a infecção e reposição volêmica (1 ml/NaCl 0,9 %, s.c.). (teste Log-rank (Mantel-Cox)). O percentual de sobrevivência foi avaliado por 96 h.

4.7 Escore clínico dos animais tratados com estatina

Escore clínico foi avaliado no grupo ISC (n=34), grupo ISC tratado com atorvastatina (n=37) ou sinvastatina (n=37). Na figura 4.6 constatamos que os animais tratados com atorvastatina tiveram um melhor prognóstico da sepse 6, 24 e 48 h após indução da sepse. Observamos ainda que os animais tratados com sinvastatina apresentaram uma menor gravidade 6 e 48 h após injeção do sobrenadante cecal, quando comparados aos animais ISC.

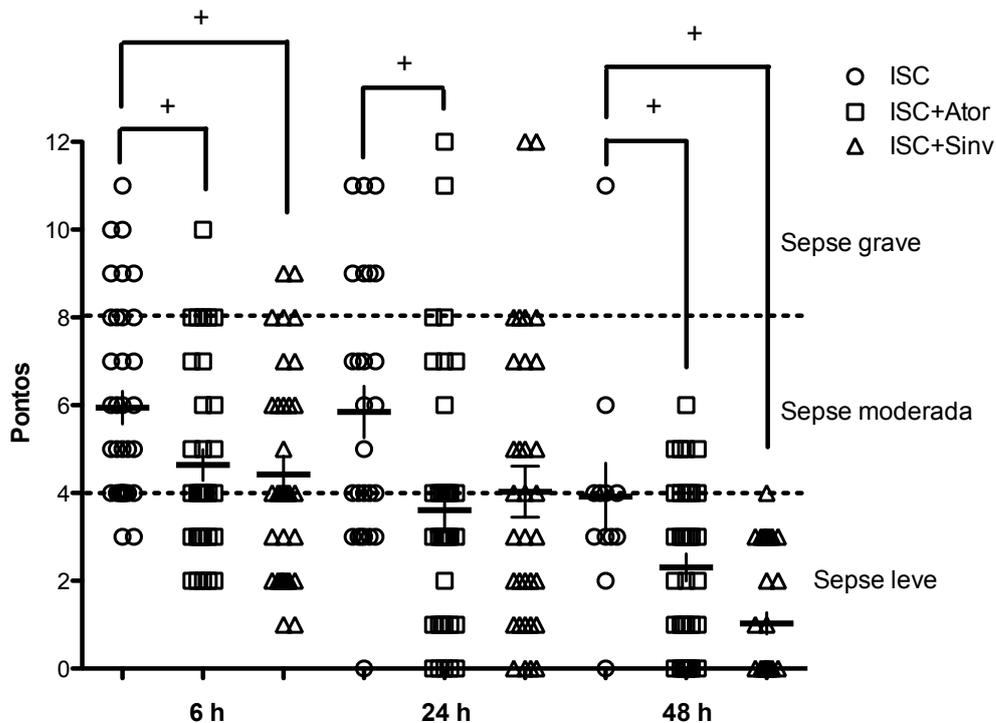
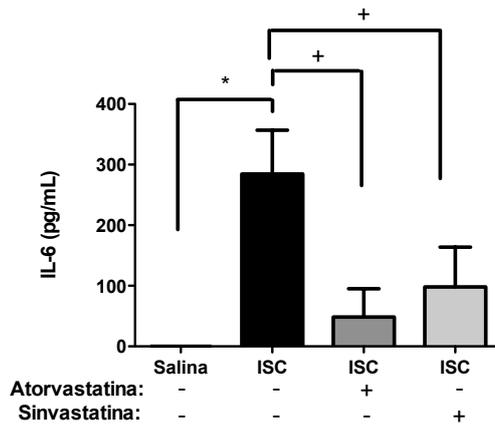


Figura 4.6: Efeito do tratamento com estatinas na quantificação e qualificação da gravidade da sepse. Análises comportamentais realizada em animais do grupo controle ISC (n=34), animais do grupo ISC tratados com atorvastatina (n=37) e animais ISC tratados com sinvastatina (n=37) em 6, 24 e 48 h, determinando o efeito das estatinas sobre a gravidade da sepse nos animais. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ pelo teste ANOVA, post-hoc teste de Tukey.

4.8 Efeito das estatinas nos níveis plasmáticos e cerebrais de IL-6 em 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal

A figura 4.7 apresenta a análise de IL-6 no plasma dos animais em 6 h (Figura 4.7A) e 24 h (Figura 4.7B) após injeção do sobrenadante cecal. Podemos observar que os animais do grupo ISC apresentaram níveis plasmáticos de IL-6 significativamente mais elevados que os animais do grupo salina 6 e 24 h após indução da sepse. Observamos ainda que os grupos ISC tratados com atorvastatina e sinvastatina tiveram uma redução significativa nos níveis plasmáticos de IL-6 em comparação com os animais do grupo ISC em 6 e 24 h após indução da sepse.

A



B

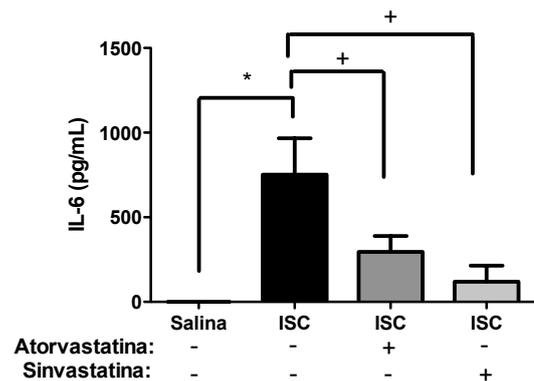
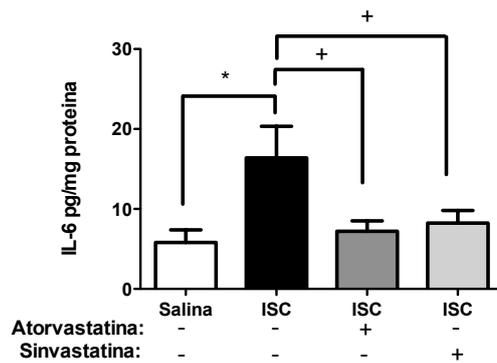


Figura 4.7. Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de IL-6 no plasma dos animais Swiss Webster: Os níveis plasmáticos de IL-6 foram obtidos pelo ensaio enzimático de ELISA, em 6 h (A) e 24 h (B) após ISC (n = 5-9/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. * $p < 0,05$ vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey; + $p < 0,05$ vs. ISC pelo teste U Mann-Whitney.

Com relação ao tecido cerebral podemos observar um aumento significativo dos níveis de IL-6 nos animais ISC em comparação ao grupo controle salina em 6 h (figura 4.8A) e 24 h (figura 4.8B). Nós observamos que o tratamento com atorvastatina ou com sinvastatina reduziu a concentração de IL-6 no tecido cerebral de forma significativa em comparação com os animais do grupo ISC 6 e 24 h após indução da sepse.

A



B

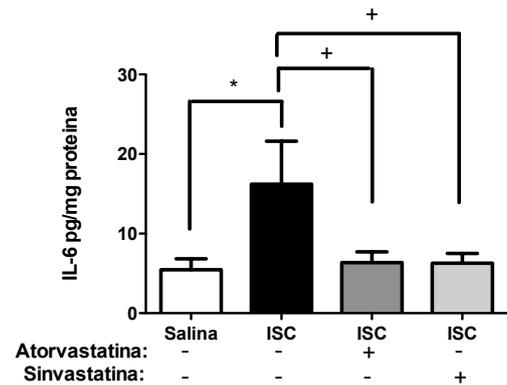


Figura 4.8. Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de IL-6 no cérebro dos animais Swiss Webster: Os níveis de IL-6 foram obtidos pelo ensaio enzimático de ELISA no tecido cerebral dos animais em 6 h (A) e 24 h (B) após ISC (n = 6-11/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibioticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. * $p < 0,05$ vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey; + $p < 0,05$ vs. ISC pelo teste U Mann-Whitney.

4.9 Efeito das estatinas nos níveis plasmáticos e cerebrais de IL-1 β em 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal

A figura 4.9 apresenta a análise da citocina IL-1 β no plasma 6 h (figura 4.9A) e 24 h (Figura 4.9B) após injeção do sobrenadante cecal. Não verificamos diferença significativa em 6 h entre os níveis de IL-1 β no grupo ISC quando comparamos ao grupo salina e o tratamento com as estatinas também não produziu diferenças significativas em relação ao grupo ISC (Figura 4.9A). Podemos observar que nos animais do grupo ISC apresentaram níveis plasmáticos de IL-1 β significativamente mais elevados que os animais do grupo controle 24 h após indução da sepse. Observamos ainda que os grupos ISC tratados com atorvastatina ou com sinvastatina apresentaram uma redução significativa nos níveis plasmáticos de IL-1 β em comparação com os animais do grupo ISC 24 h após injeção do sobrenadante cecal (figura 4.9B).

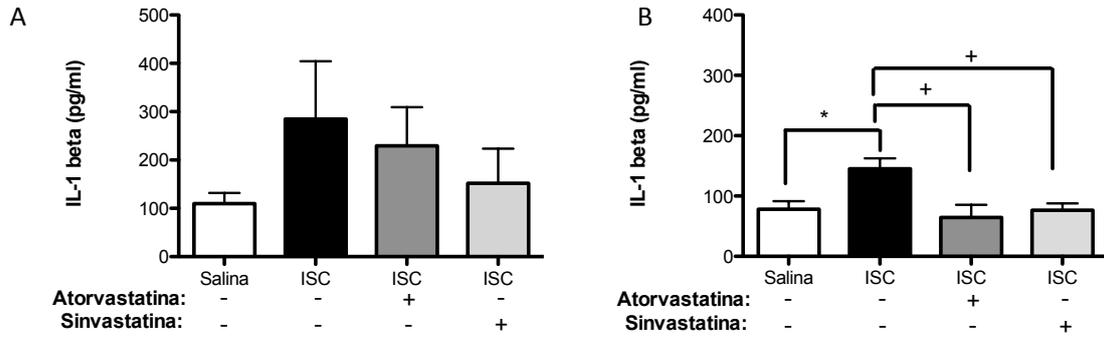


Figura 4.9. Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de IL-1 β no plasma dos animais Swiss Webster: Os níveis plasmáticos de IL-1 β foram obtidos pelo ensaio enzimático de ELISA em 6 h (A) e 24 h (B) após ISC (n = 5-8/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. *p<0,05 vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey; + p<0,05 vs. ISC pelo teste U Mann-Whitney.

Com relação ao tecido cerebral podemos observar um aumento significativo dos níveis de IL-1 β nos animais ISC em comparação ao grupo controle 6 h (figura 4.10A) e 24 h (figura 4.10B) após a indução da sepse. Nós observamos que o tratamento com atorvastatina ou com sinvastatina reduziu os níveis de IL-1 β no tecido cerebral de forma significativa em comparação com os animais do grupo ISC 6 h após injeção do sobrenadante cecal.

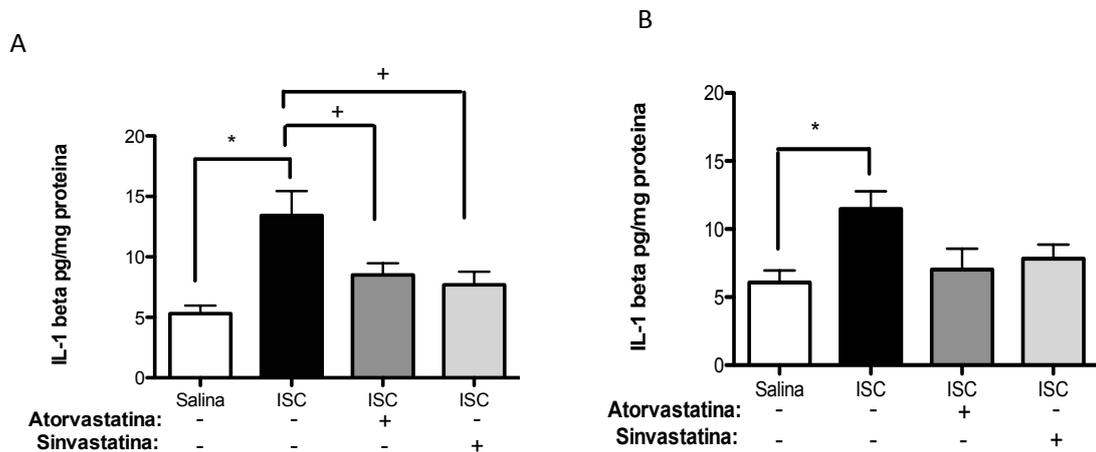


Figura 4.10. Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de IL-1 β no cérebro dos animais Swiss Webster: Os níveis de IL-1 β foram obtidos pelo ensaio enzimático de ELISA no tecido cerebral dos animais em 6 h (A) e 24 h (B) após ISC (n = 5-8/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. *p<0,05 vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey; + p<0,05 vs. ISC pelo teste U Mann-Whitney.

4.10 Efeito das estatinas nos níveis plasmáticos e cerebrais de MCP-1 em 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal

A figura 4.11 apresenta a análise da quimiocina MCP-1 no plasma em 6 h (figura 4.11A) e em 24 h (figura 4.11B) após injeção do sobrenadante cecal. Não verificamos diferença significativa em 6 h entre os níveis de MCP-1 no grupo ISC quando comparamos ao grupo salina e o tratamento com as estatinas também não produziu diferenças significativas em relação ao grupo ISC (figura 4.11A). Podemos observar que os animais do grupo ISC apresentaram níveis plasmáticos de MCP-1 significativamente mais elevados que os animais do grupo controle 24 h após indução da sepse.

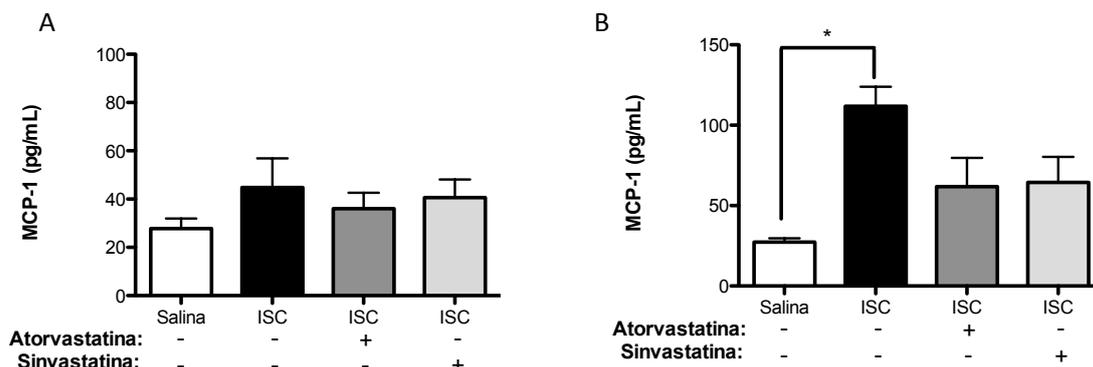


Figura 4.11. Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de MCP-1 no plasma dos animais Swiss Webster: Os níveis plasmáticos de MCP-1 foram obtidos pelo ensaio enzimático de ELISA em 6 h (A) e 24 h (B) após ISC (n = 4-5/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. *p<0,05 vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey; + p<0,05 vs. ISC pelo teste U Mann-Whitney.

No tecido cerebral podemos observar um aumento significativo dos níveis de MCP-1 nos animais ISC em comparação ao grupo controle salina 6 h (figura 4.12A) e 24 h (figura 4.12B) após indução da sepse. Observamos que o tratamento com atorvastatina ou com sinvastatina reduziu os níveis de MCP-1 no tecido cerebral de forma significativa em comparação com os animais do grupo ISC 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal.

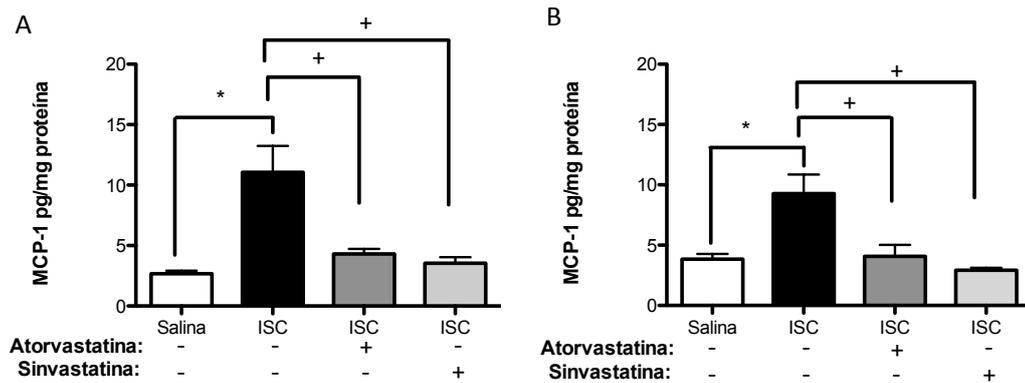


Figura 4.12. Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de MCP-1 no cérebro dos animais Swiss Webster: Os níveis de MCP-1 foram obtidos pelo ensaio enzimático de ELISA no tecido cerebral dos animais, em 6 h (A) e 24 h (B) após ISC (n = 5-10/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. * $p < 0,05$ vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey; + $p < 0,05$ vs. ISC pelo teste U Mann-Whitney.

4.11 Efeito das estatinas nos níveis plasmáticos e cerebrais de KC em 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal

A figura 4.13 representa a análise da quimiocina KC no plasma em 6 h (figura 4.13A) e em 24 h (figura 4.13B) após injeção do sobrenadante cecal. Podemos observar que nos animais do grupo ISC apresentaram níveis plasmáticos de KC significativamente mais elevados que os animais do grupo controle 24 h após a ISC. Observamos ainda que os grupos ISC tratados com atorvastatina ou com sinvastatina tiveram uma redução significativa nos níveis plasmáticos de KC em comparação com os animais do grupo ISC 24 h após indução da sepse.

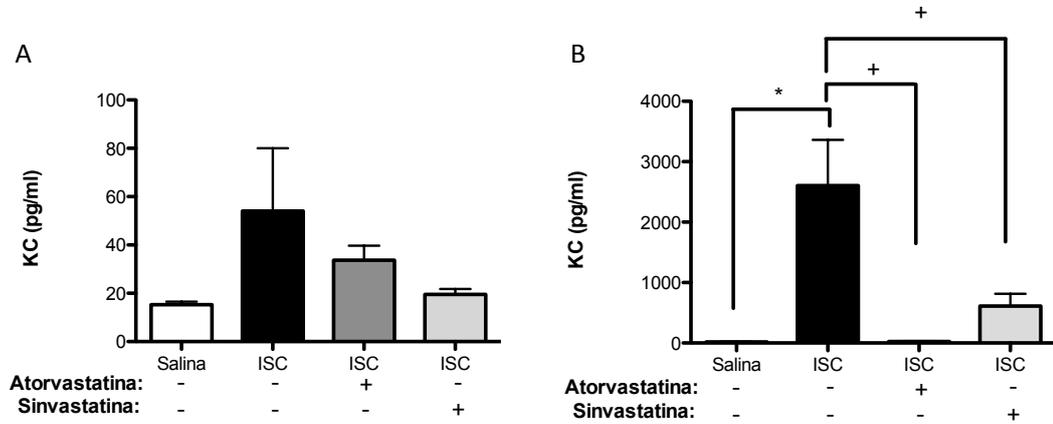


Figura 4.13. Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de KC no plasma dos animais Swiss Webster: Os níveis plasmáticos de KC foram obtidos pelo ensaio enzimático de ELISA em 6 h (A) e 24 h (B) após ISC (n = 3-6/ grupo).. Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. *p<0,05 vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey; + p<0,05 vs. ISC pelo teste U Mann-Whitney.

No tecido cerebral podemos observar um aumento significativo dos níveis de KC nos animais ISC em comparação ao grupo controle 6 h (figura 4.14A) e 24 h (figura 4.14B) após o estímulo. O tratamento com as estatinas não produziu diferenças significativas em relação ao grupo ISC em 6 e 24 h após indução da sepse.

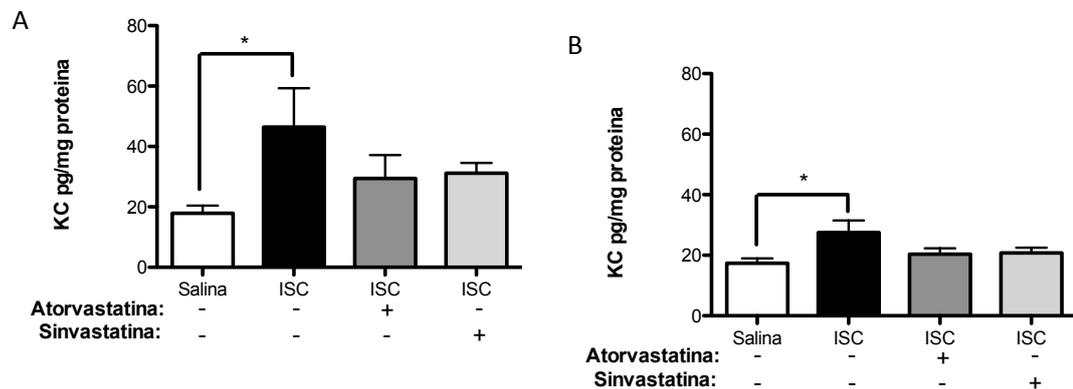


Figura 4.14. Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de KC no cérebro dos animais Swiss Webster: Os níveis de KC foram obtidos pelo ensaio enzimático de ELISA no tecido cerebral dos animais em 6 h (A) e 24 h (B) após ISC (n = 5-7/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. *p<0,05 vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey; + p<0,05 vs. ISC pelo teste U Mann-Whitney.

4.12 Efeito das estatinas nos níveis plasmáticos e cerebrais de IL-10 em 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal

A figura 4.13 representa a análise da citocina IL-10 no plasma 6 h (figura 4.15A) e 24 h (figura 4.15B) após injeção do sobrenadante cecal. Podemos observar que nos animais do grupo ISC apresentaram níveis plasmáticos de IL-10 significativamente mais elevados que os animais do grupo controle 6 h. O tratamento com as estatinas proporcionou níveis significativamente reduzidos de IL-10 em comparação ao animais ISC, em 6 h após indução da sepse.

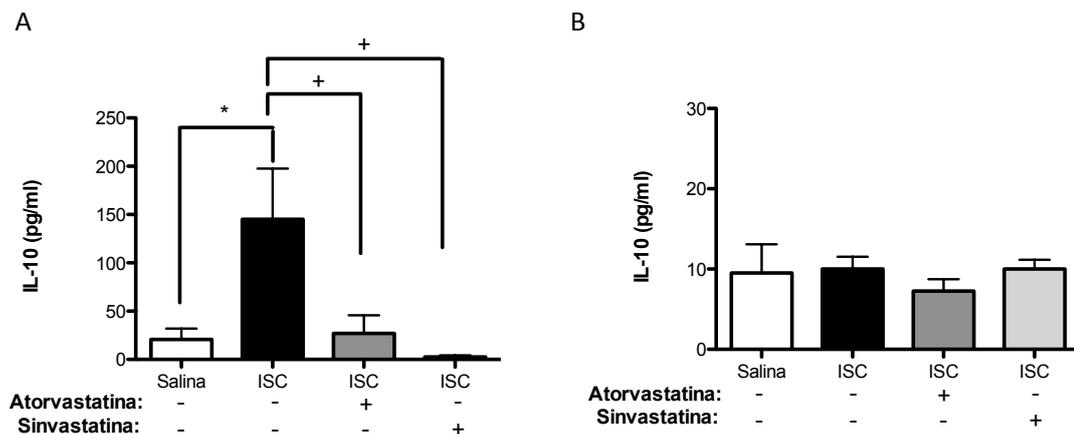


Figura 4.15. Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de IL-10 no plasma dos animais Swiss Webster: Os níveis plasmáticos de IL-10 foram obtidos pelo ensaio enzimático de ELISA em 6 h (A) e 24 h (B) após ISC (n = 3-4/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. * $p < 0,05$ vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey; + $p < 0,05$ vs. ISC pelo teste U Mann-Whitney.

No tecido cerebral podemos observar uma diminuição significativa dos níveis de IL-10 nos animais ISC não tratados em comparação ao grupo controle 6 h (figura 4.16A) e 24 h (figura 4.16B) após o estímulo. Nós observamos que o tratamento com atorvastatina ou com sinvastatina aumentou significativamente a concentração de IL-10 no tecido cerebral em comparação com os animais do grupo ISC 6 h após a indução da sepse.

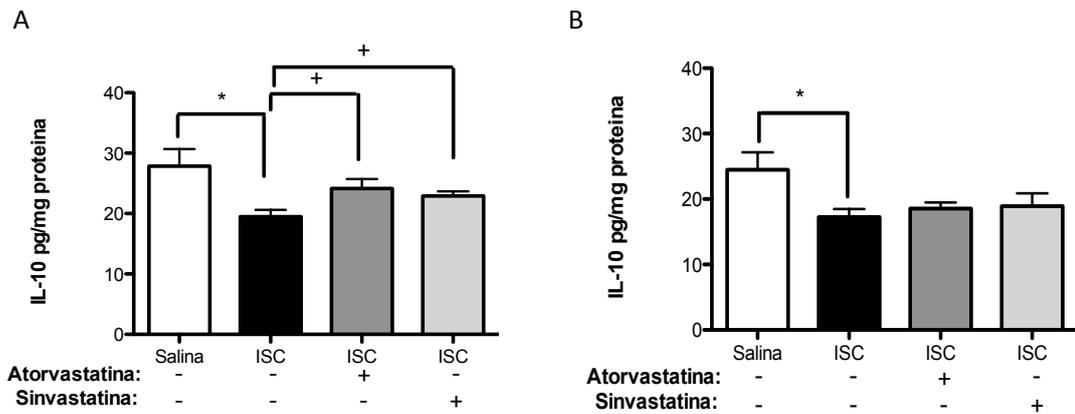


Figura 4.16. Efeito do tratamento com estatinas sobre a concentração de IL-10 no cérebro dos animais Swiss Webster: Os níveis de IL-10 foram obtidos pelo ensaio enzimático de ELISA no tecido cerebral dos animais em 6 h (A) e 24 h (B) após ISC (n = 5-10/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibioticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. *p<0,05 vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey; + p<0,05 vs. ISC pelo teste U Mann-Whitney.

4.13 Avaliação de estresse oxidativo no cérebro dos animais tratados com estatinas 6 e 24 h injeção do sobrenadante cecal

A figura 4.17 apresenta a quantificação de lipídios peroxidados no tecido cerebral dos animais 6 h (figura 4.17A) e 24 h (figura 4.17B) após injeção do macerado cecal. Observamos que houve aumento significativo nos níveis de MDA no grupo ISC em comparação aos animais 6 h após a indução da sepse. Os animais controle apresentaram dosagem média de $1,6 \times 10^{-9}$ nmol/mg de proteína e os ISC $2,77 \times 10^{-9}$ nmol/mg de proteína (Figura 4.18A). Verificamos ainda que o tratamento com atorvastatina ou com sinvastatina diminuiu significativamente os níveis de MDA 6 h após ISC. Os animais ISC tratados com atorvastatina apresentaram dosagem média de $1,9 \times 10^{-9}$ nmol/mg de proteína e os ISC tratados com sinvastatina, $2,05 \times 10^{-9}$ nmol/mg de proteína (Figura 4.18A). No tempo de 24 h após indução da sepse não observamos alterações significativas nos níveis de MDA (Figura 4.18B).

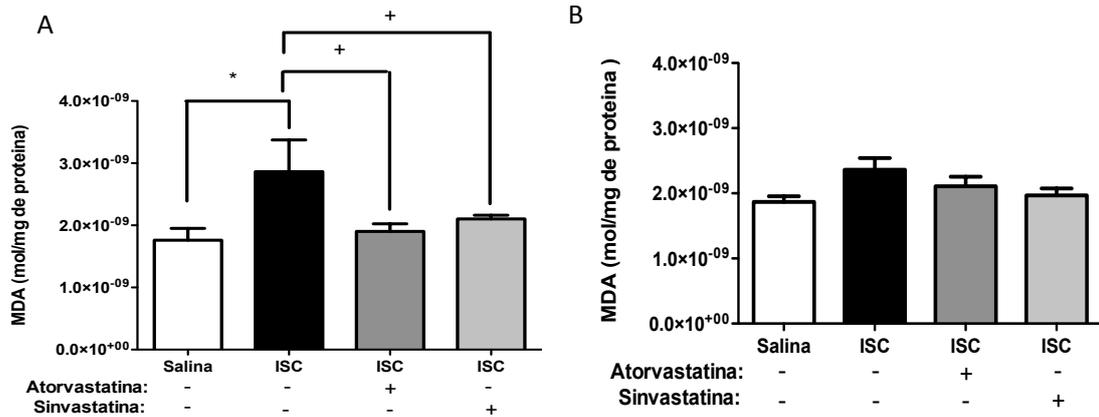


Figura 4.17. Efeito do tratamento com estatinas sobre os níveis de MDA no cérebro dos animais Swiss Webster: Os níveis de MDA foram obtidos por TBARs no tecido cerebral dos animais em 6 h (A) e 24 h (B) após ISC (n = 5-10/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou simvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. *p<0,05 vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey; + p<0,05 vs. ISC pelo teste U Mann-Whitney.

4.14 Análise de mieloperoxidase em 6 e 24 h no cérebro dos animais tratados com estatinas

A figura 4.18 apresenta o resultado da análise de MPO no tecido cerebral dos animais em 6 h (figura 4.18A) e 24 h (figura 4.18B) após injeção do macerado cecal. Observamos um aumento significativo nos níveis de mieloperoxidase nos animais ISC em relação aos animais controle 6 h e 24 h após injeção intraperitoneal do sobrenadante cecal. O tratamento com atorvastatina ou com simvastatina reduziu significativamente os níveis de mieloperoxidase em relação aos animais do grupo ISC em 6 e 24 h após indução da sepse.

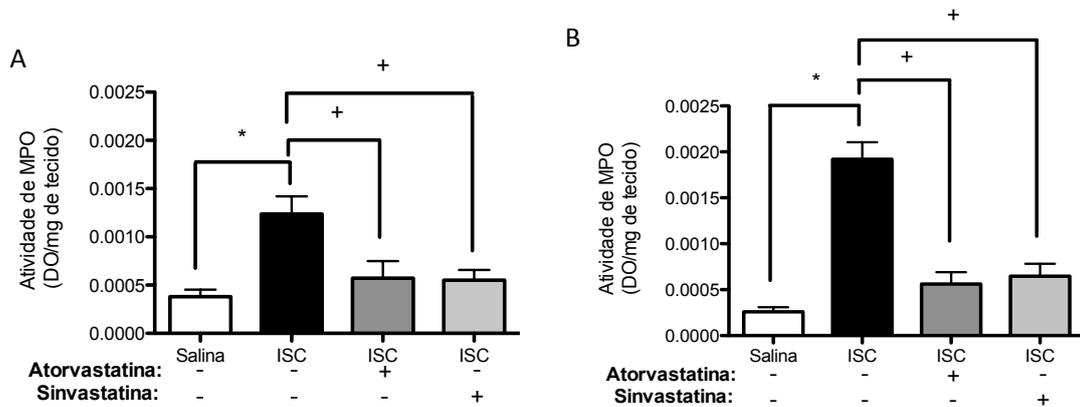


Figura 4.18. Efeito do tratamento com estatinas sobre os níveis de mieloperoxidase no cérebro dos animais Swiss Webster: Os níveis de MPO foram obtidos no tecido cerebral dos animais em 6 h (A) e 24 h (B) após ISC (n = 5-10/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibioticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. *p<0,05 vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey; + p<0,05 vs. ISC pelo teste U Mann-Whitney.

4.15 Efeito da estatinas sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica por quantificação de Azul de Evans no cérebro dos animais 6 h após infecção

A figura 4.19 apresenta o resultado da análise da alteração de permeabilidade na BHE no cérebro dos animais 6 h após injeção do sobrenadante cecal. Observamos que houve um aumento significativo na permeabilidade da BHE nos animais ISC em comparação com os animais salina. O tratamento com as estatinas não protegeu a BHE.

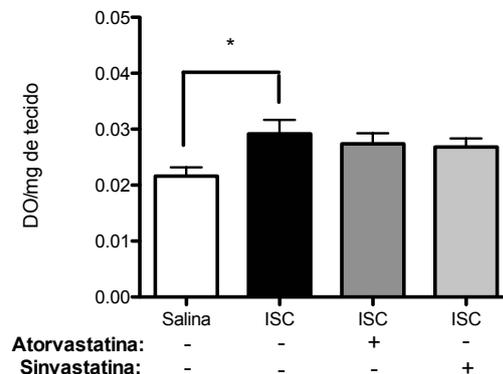


Figura 4.19. Avaliação do edema cerebral pela quantificação de azul de Evans: Alteração na permeabilidade da BHE foram obtidos no tecido cerebral dos animais em 6 h após ISC (n = 5-6/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibioticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. *p<0,05 vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey.

4.16 Análise da intensidade de fluorescência com anti-IBA-1 em 6 h no hipocampo dos animais tratados com estatina.

Na figura 4.20 observamos o resultado da análise de quantificação das fotomicrografias realizadas em microscópio óptico para marcação com anti-IBA1 na região CA1 do hipocampo dos animais. Podemos visualizar um aumento significativo na fluorescência de IBA-1 na região CA1 do hipocampo nos animais ISC em comparação aos animais controle 6 h após injeção intraperitoneal do sobrenadante cecal. O tratamento com as estatinas não proporcionou redução significativa na intensidade de fluorescência. Na figura 4.23 podemos visualizar as imagens representativas por microscopia confocal da região CA1 para marcação de IBA-1 entre os grupos: salina (A,C), ISC (B,D), ISC tratado com atorvastatina (E,G) ou com sinvastatina (F,H) com diferenças na morfologia das micróglia.

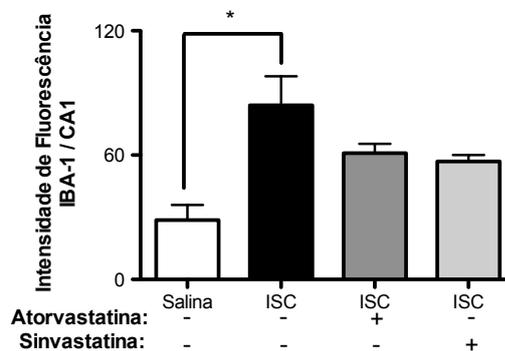


Figura 4.20. Intensidade de Fluorescência de IBA-1 na região CA1 do hipocampo dos animais Swiss Webster: Quantificação no tecido cerebral em 6 h após ISC (n = 7-10/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. * $p < 0,05$ vs. salina pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey.

A figura 4.21 apresenta o resultado da análise da intensidade de fluorescência de IBA-1 na região do giro denteado (GD) do hipocampo 6 h após injeção intraperitoneal do sobrenadante cecal. Não observamos diferença significativa na intensidade da marcação fluorescente entre os grupos. Na Figura 4.24 podemos visualizar as imagens representativas por microscopia confocal da região do GD para marcação de IBA-1 entre os grupos: salina (A,C), ISC (B,D), ISC tratado com atorvastatina (E,G) e ISC tratado com sinvastatina (F,H) e a morfologia da micróglia.

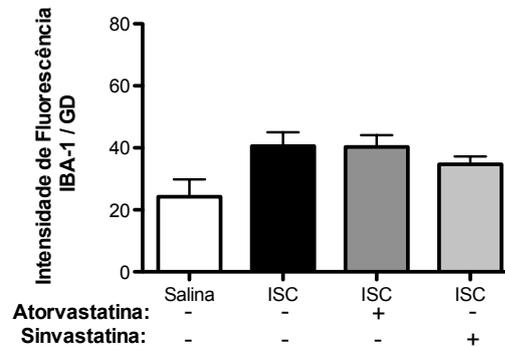


Figura 4.21. Intensidade de Fluorescência de IBA-1 na região GD do hipocampo dos animais Swiss Webster: Quantificação no tecido cerebral em 6 h após ISC (n = 7-10/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. ANOVA com post-hoc teste de Tukey.

Na Figura 4.22 observamos o resultado da análise da intensidade de fluorescência de IBA-1 na região CA3 do hipocampo dos animais. Podemos visualizar um aumento significativo na intensidade de fluorescência para IBA-1 na região CA3 do hipocampo nos animais ISC em relação aos animais controle (* $p < 0,05$ pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey), 6 h após injeção intraperitoneal do sobrenadante cecal. O tratamento com sinvastatina proporcionou uma redução significativa na intensidade de fluorescência para IBA-1. O tratamento com atorvastatina não gerou diferença significativa na intensidade de fluorescência. Na Figura 4.25 podemos visualizar as imagens representativas por microscopia confocal da região CA3 para marcação de IBA-1 entre os grupos: salina (A,C), ISC (B,D), ISC tratado com atorvastatina (E,G) e ISC tratado com sinvastatina (F,H) e as diferenças na morfologia da micróglia.

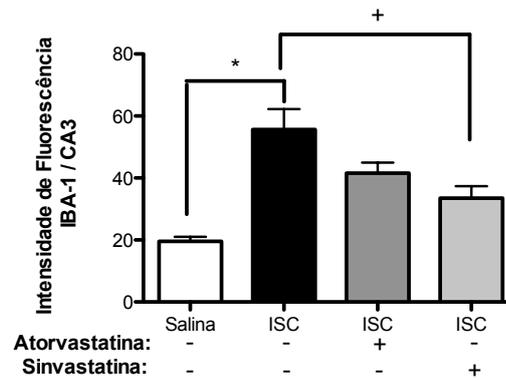


Figura 4.22. Intensidade de Fluorescência de IBA-1 na região CA3 do hipocampo dos animais Swiss Webster: Quantificação no tecido cerebral em 6 h após ISC (n = 7-10/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. * $p < 0,05$ vs. salina e + $p < 0,05$ vs. ISC pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey.

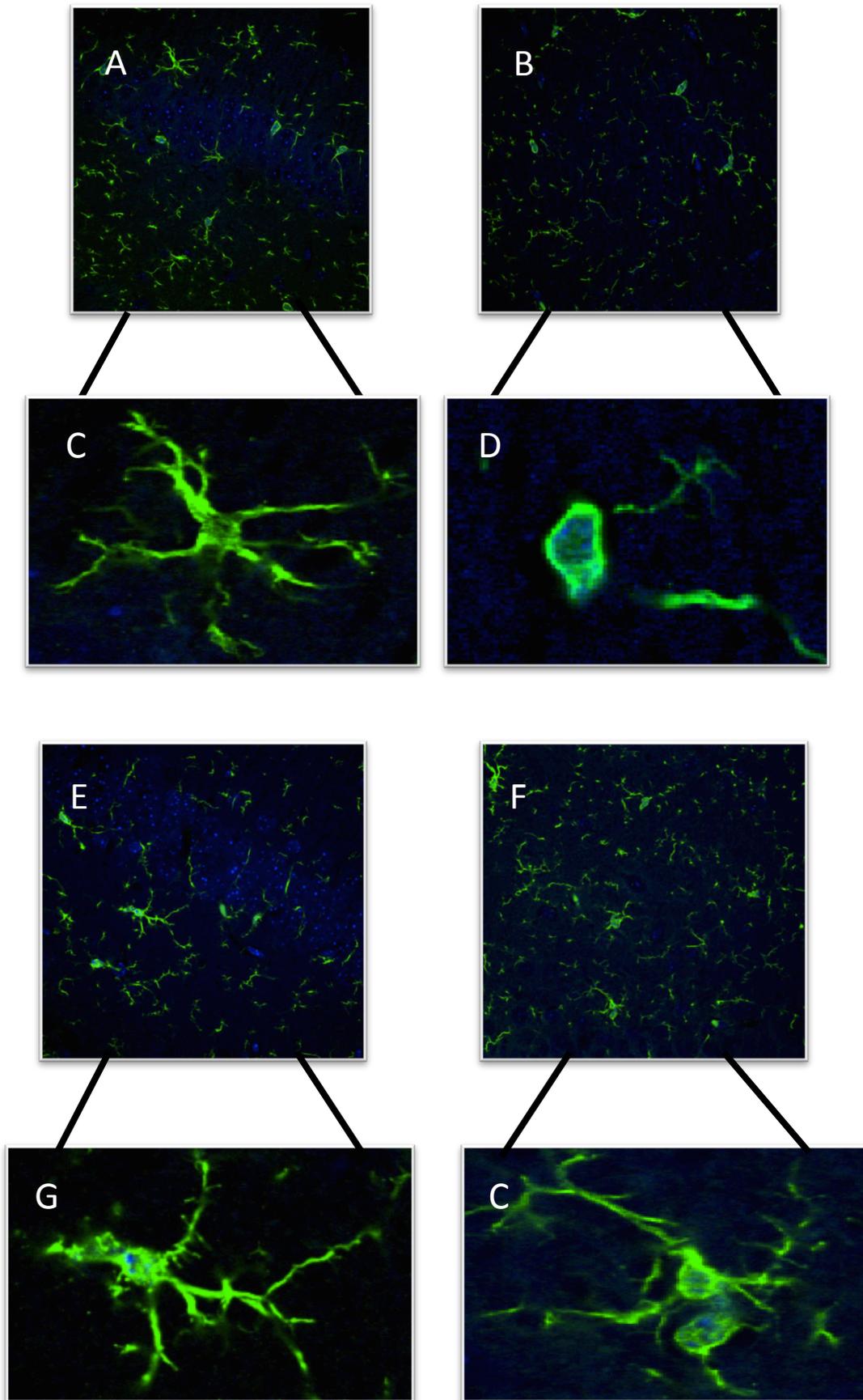


Figura 4.23. Fotomicrografia representativa da marcação de fluorescência para IBA-1 na região CA1 do hipocampo dos animais Swiss Webster: controle (A,C), ISC (B,D), ISC tratados com atorvastatina (E,G) ou com sinvastatina (F,H) 6 h após injeção do sobrenadante cecal. (A,B,E,F aumento de 60x) (C,D,G,H aumento de 300x).

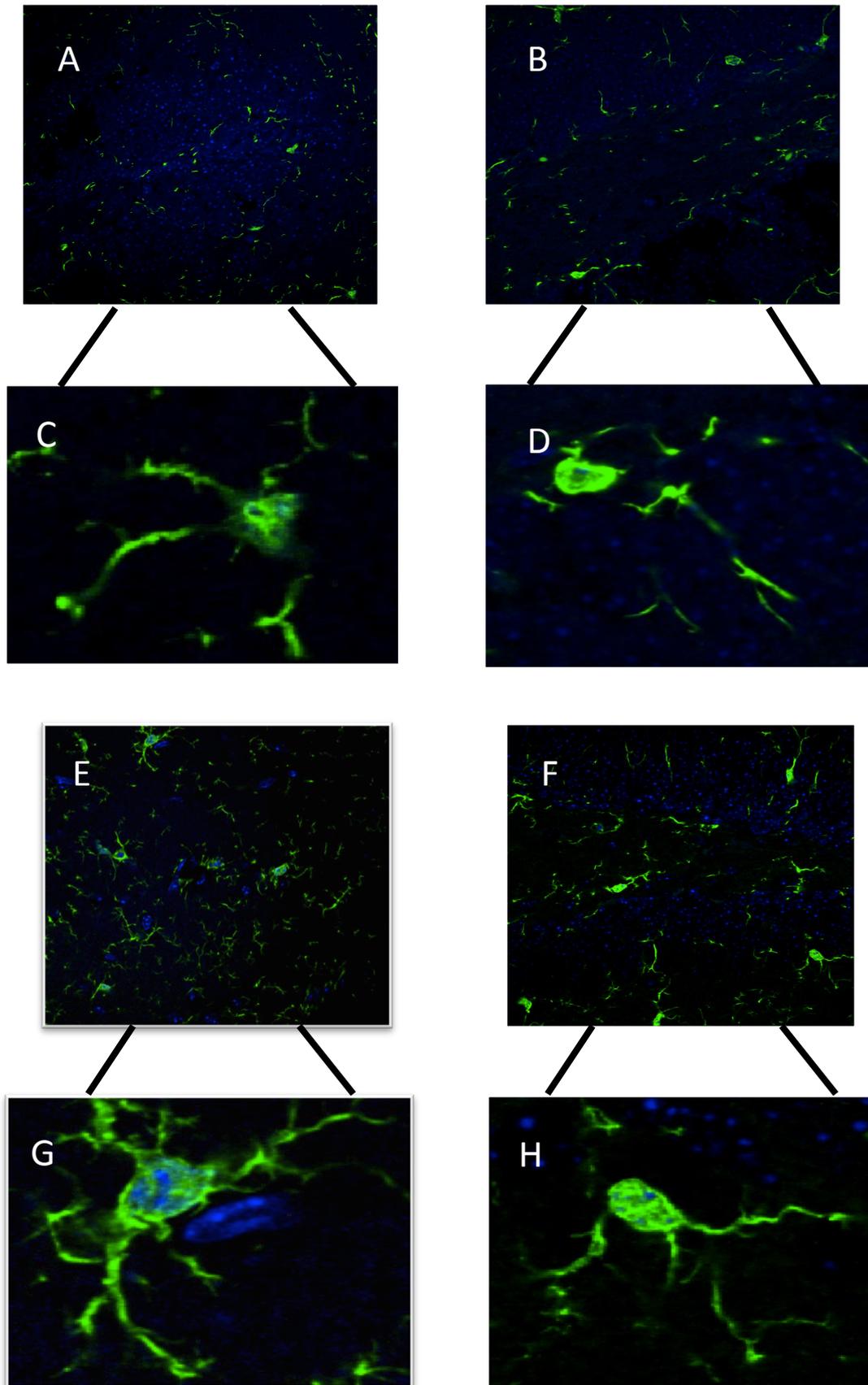


Figura 4.24. Fotomicrografia representativa da marcação de fluorescência para IBA-1 na região GD do hipocampo dos animais Swiss Webster: controle (A,C), ISC (B,D), ISC tratados com atorvastatina (E,G) ou com sinvastatina (F,H) 6 h após injeção do sobrenadante cecal. (A,B,E,F aumento de 60x) (C,D,G,H aumento de 300x).

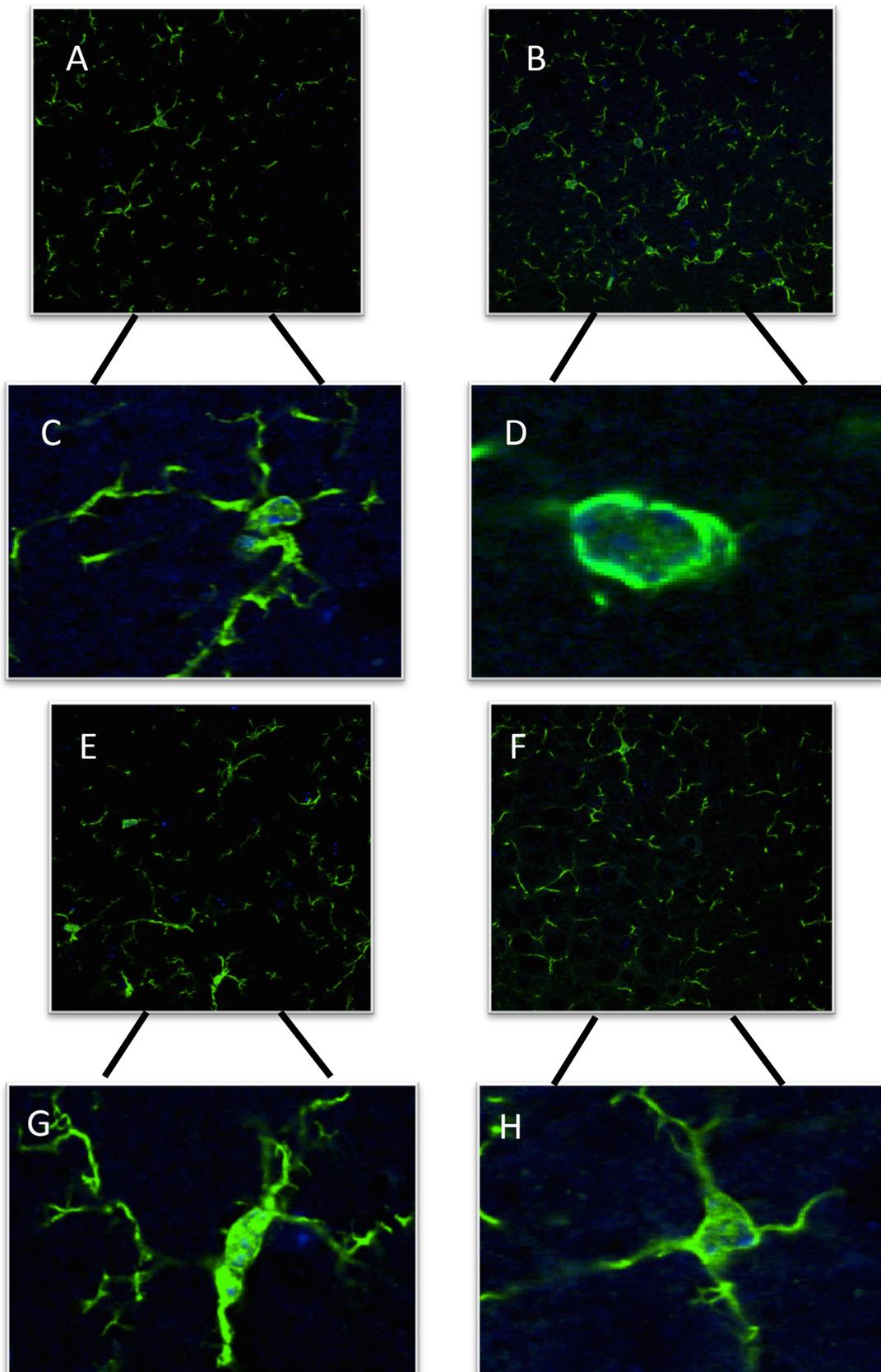


Figura 4.25. Fotomicrografia representativa da marcação de fluorescência para IBA-1 na região CA3 do hipocampo dos animais Swiss Webster: controle (A,C), ISC (B,D), ISC tratados com atorvastatina (E,G) ou com simvastatina (F,H) 6 h após injeção do sobrenadante cecal. (A,B,E,F aumento de 60x) (C,D,G,H aumento de 300x).

4.17 Microscopia Intravital no cérebro dos animais tratados com estatina em 6 h e 24 h após ISC

A figura 4.26 representa a análise da microscopia intravital 6 h após injeção do sobrenadante cecal. Observamos um aumento significativo do rolamento (figura 4.26C) e da adesão (figura 4.26B) de leucócitos nas paredes venulares pós-capilares cerebrais e contração arteriolar em resposta ao estímulo com ACh (acetilcolina) (figura 4.26D) nos animais ISC em relação aos animais controle. Não foram observadas diferenças significativas na densidade capilar funcional cerebral entre os grupos. O tratamento com atorvastatina ou com sinvastatina reduziu significativamente o rolamento e adesão de leucócitos e o tratamento com atorvastatina produziu um relaxamento arteriolar quando estimulada com ACh em relação aos animais do grupo ISC 6 h após indução da sepse. Na figura 4.27 podemos visualizar imagens representativas do leito capilar (A-D) e a adesão de leucócitos nas vênulas (E-H).

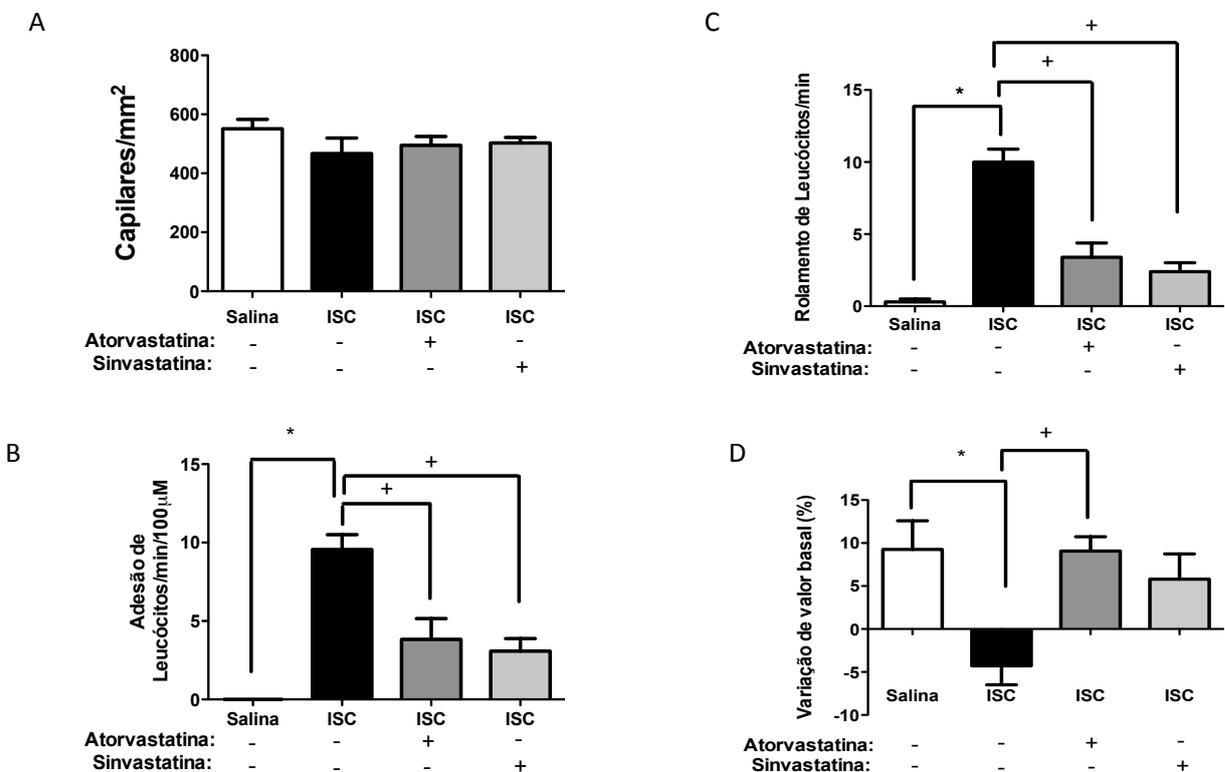


Figura 4.26. Efeitos do tratamento com estatinas sobre a microcirculação cerebral de animais Swiss Webster. A- densidade capilar funcional; B-adesão de leucócitos; C- rolamento de leucócitos na parede venular e variação do diâmetro interno arteriolar em resposta a administração tópica de ACh 100 µM(D): Análise no cérebro 6 h após ISC (n = 5/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. *p<0,05 vs. salina e + p<0,05 vs. ISC; pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Bonferroni.

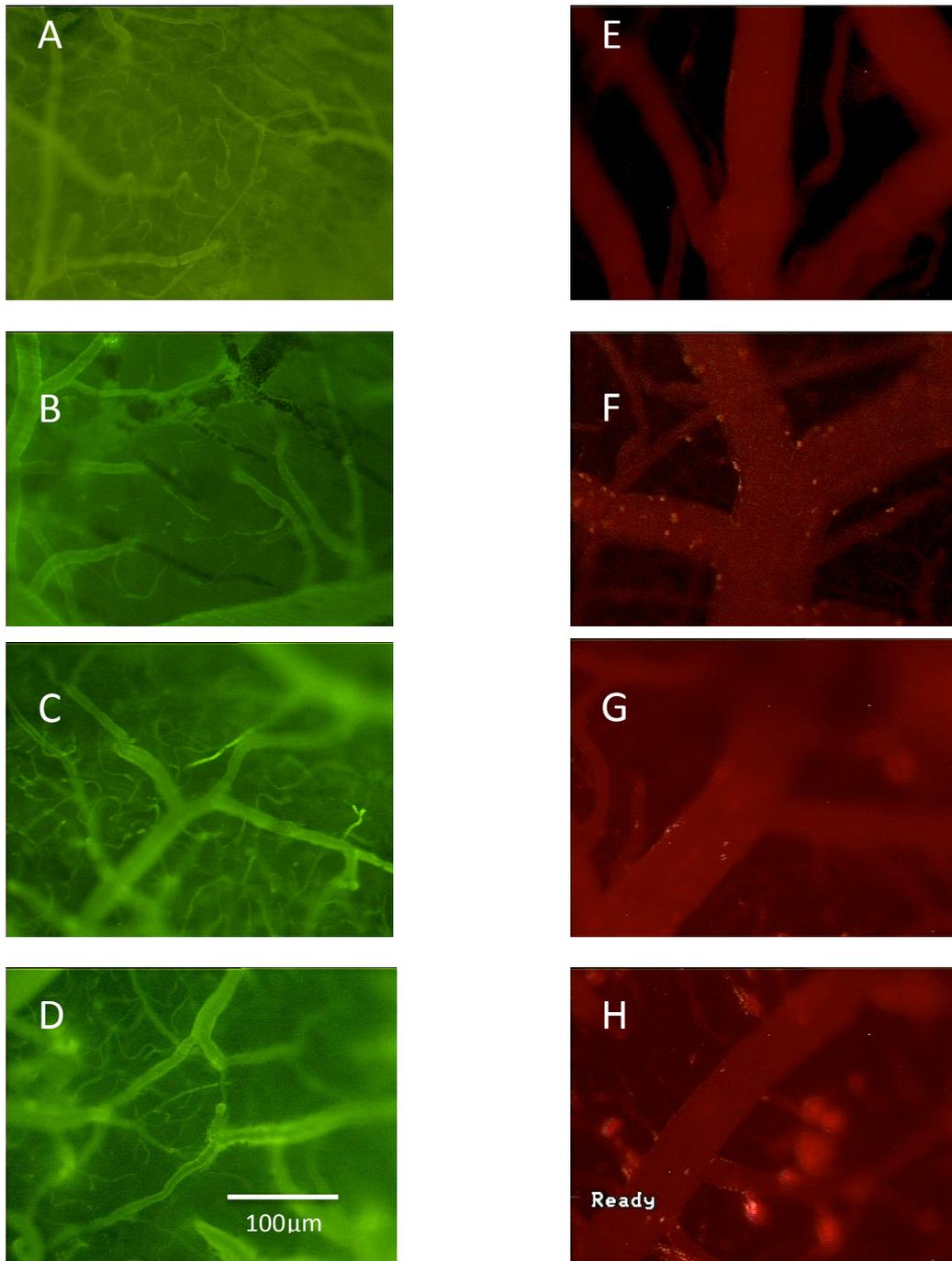


Figura 4.27 Fotomicrografias representativas da microcirculação da membrana pial de animais Swiss Webster. A-D; imagens representativas de capilares espontaneamente perfundidos dos animais do grupo Salina, ISC, ISC+ATOR, ISC+SINV, respectivamente. E-H; imagens representativas de leucócitos marcados com rodamina 6G aderidos e/ou rolando nas vênulas pós capilares cerebrais de animais dos grupos Salina, ISC, ISC+ATOR, ISC+SINV, respectivamente.

A figura 4.28 representa os resultados da microscopia intravital 24 h após injeção do sobrenadante cecal. Observamos uma diminuição significativa no número de capilares (figura 4.28A) nos animais ISC em relação ao grupo salina. Observamos um aumento significativo no rolamento (figura 4.28C) e na adesão (figura 4.28B) de leucócitos nas vênulas pós-capilares cerebrais e contração arteriolar em resposta ao estímulo com ACh (figura 4.28D) nos animais ISC em relação aos animais salina 24 h após indução da sepse. O tratamento com atorvastatina demonstrou ser protetor, já que os animais apresentaram um número significativamente maior de capilares espontaneamente perfundidos em relação ao grupo ISC. O tratamento com sinvastatina reduziu significativamente o rolamento de leucócitos e produziu um relaxamento das arteríolas analisadas quando estimulada com ACh em relação aos animais do grupo ISC 24 h após indução da sepse. Na figura 4.29 podemos visualizar imagens ilustrativas da área capilar (A-D) e a adesão e/ou rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares cerebrais (E-H).

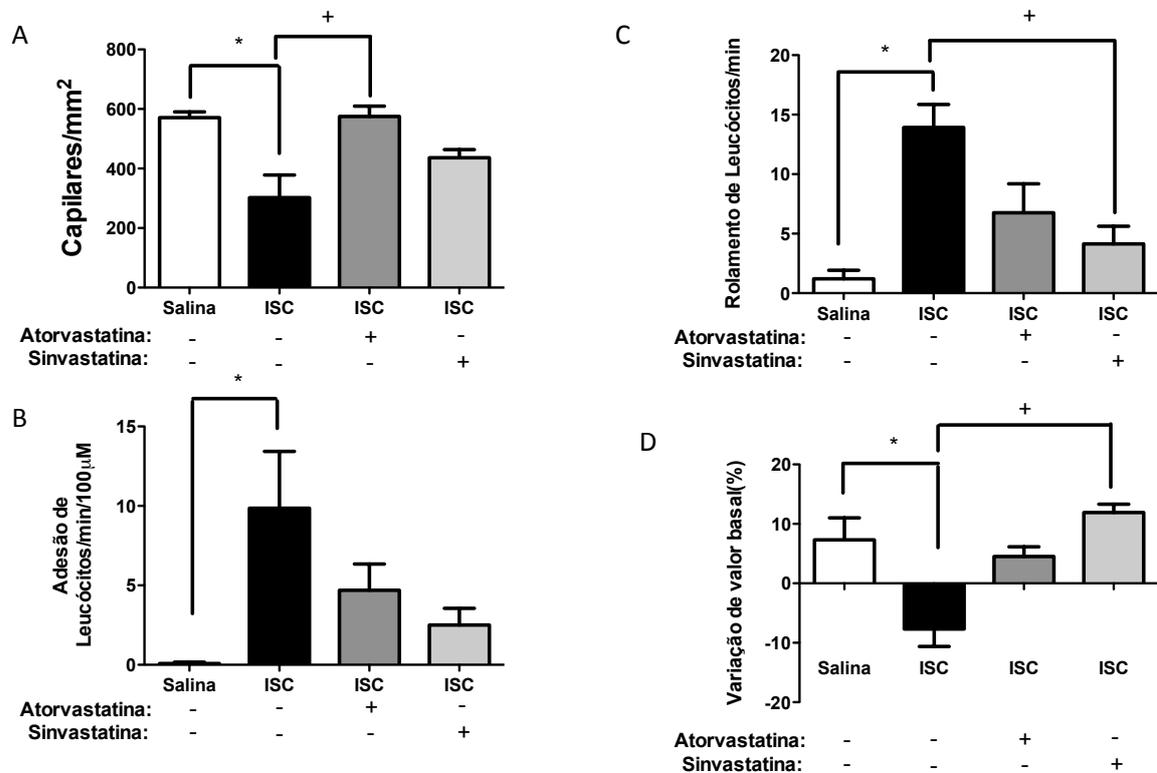


Figura 4.28. Efeitos do tratamento com estatinas sobre a microcirculação cerebral de animais Swiss Webster. A- densidade capilar funcional; B-adesão de leucócitos; C- rolamento de leucócitos na parede venular e variação do diâmetro interno arteriolar em resposta a administração tópica de ACh 100 μ M(D). Análise no cérebro 24 h após ISC (n = 5/ grupo). Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. *p<0,05 vs. salina e + p<0,05 vs. ISC; pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Bonferroni.

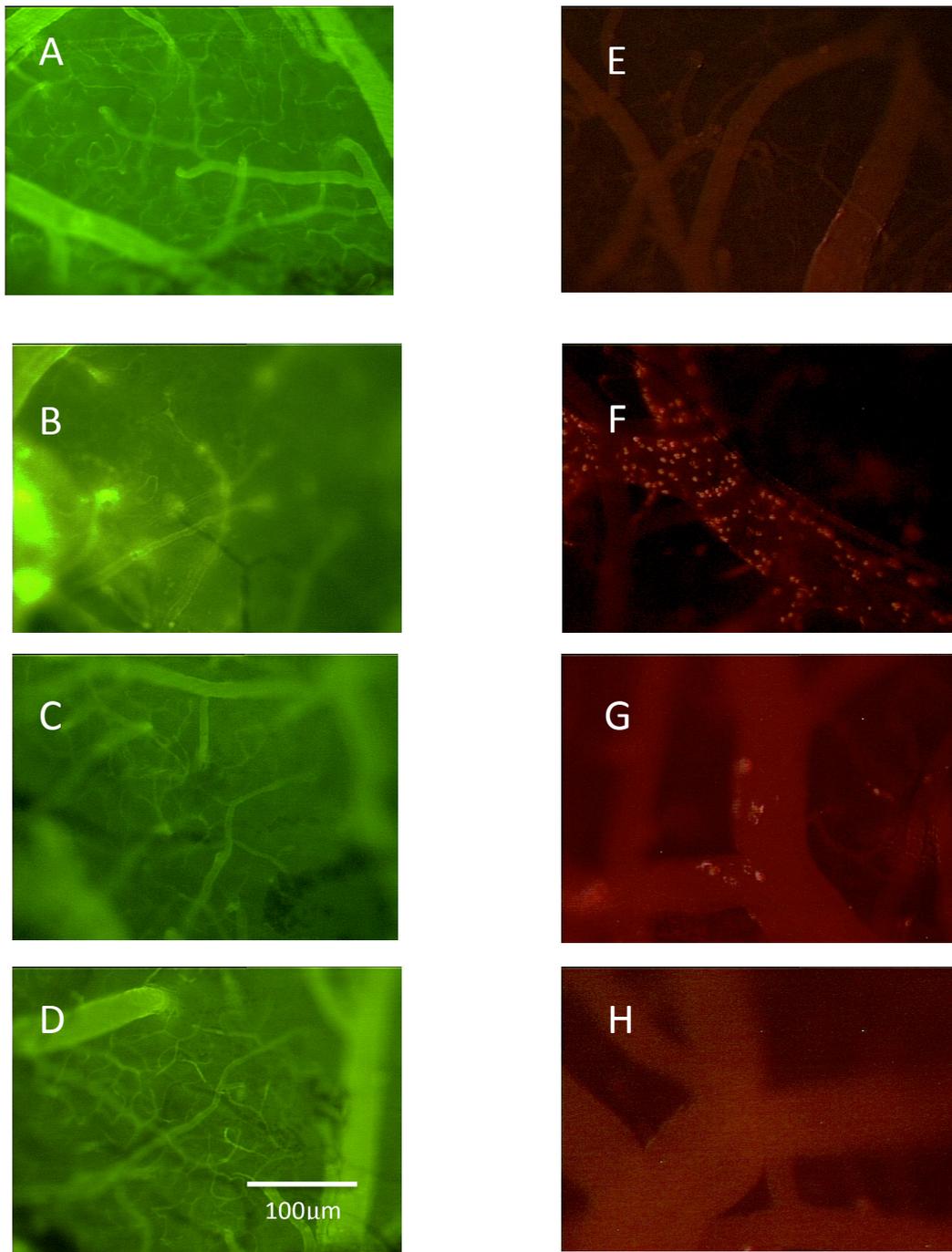


Figura 4.29. Fotomicrografias representativas da microcirculação da membrana pial de animais Swiss Webster. A-D; imagens representativas de capilares espontaneamente perfundidos dos animais do grupo Salina, ISC, ISC+ATOR, ISC+SINV, respectivamente. E-H; imagens representativas de leucócitos marcados com rodamina 6G aderidos e/ou rolando nas vênulas pós capilares cerebrais de animais dos grupos Salina, ISC, ISC+ATOR, ISC+SINV, respectivamente.

4.18 Teste de esQUIVA Inibitória nos animais tratados com estatina 15 dias após a ISC

A figura 4.30 representa os resultados da avaliação cognitiva pelo teste de esQUIVA inibitória. Observamos que o tempo de latência na plataforma dos animais do grupo ISC foi significativamente menor que os animais do grupo salina em relação a memória de curta duração (STM – figura 4.30A). O tratamento com as estatinas aumentou significativamente o tempo de permanência na plataforma. Ao analisarmos o teste em 24 h, observamos que os animais ISC se mantiveram significativamente menos tempo sobre a plataforma que os animais do grupo salina em relação a memória de longa duração (LTM – figura 4.30B) e que o tratamento com as estatinas aumentou significativamente o tempo de permanência na plataforma.

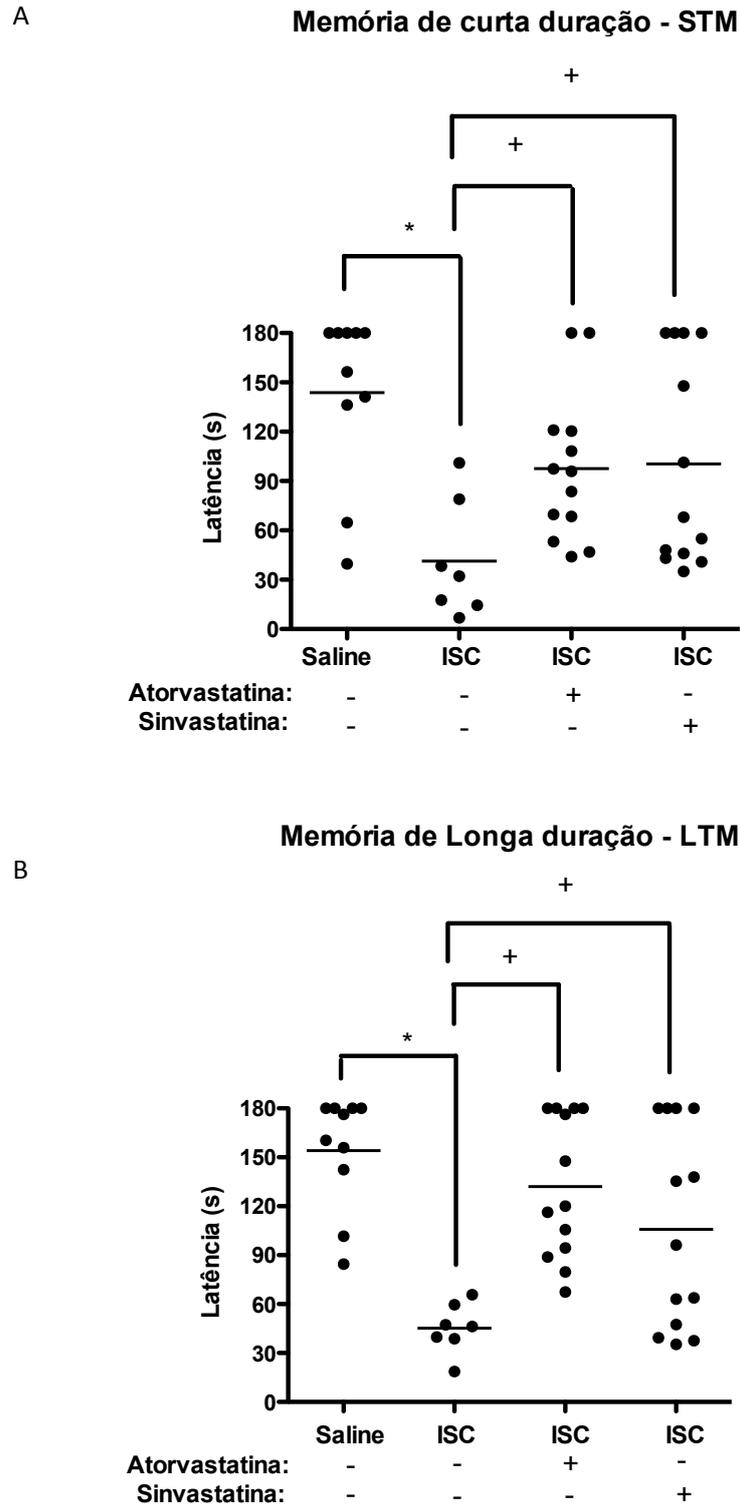


Figura 4.30. Avaliação de perda de memória aversiva no modelo de esQUIVA inibitória. (A) No 15º dia os animais (n=7-13 /grupo) foram submetidos a sessão de teste e o tempo de latência sobre a plataforma foi registrado e imediatamente após descerem da plataforma receberam um choque. (B) 24 h após o treino a memória aversiva foi testada, com registro do tempo de latência na plataforma (com um *cut-off* de 180 seg.) Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h. (* $p < 0,05$ vs. Salina; + $p < 0,05$ vs. ISC, Mann-Whitney U test).

4.19 Teste do labirinto aquático de Morris nos animais tratados com estatina 15 dias após a ISC

A figura 4.31 representa os resultados da avaliação cognitiva pelo teste de labirinto aquático de Morris. Observamos que no quarto dia de treino na piscina os animais ISC tiveram um tempo de latência de nado significativamente maior em relação aos animais salina. Também podemos verificar que os tratamento com as estatinas reduziu significativamente o tempo de latência do nado em comparação aos animais do grupo ISC.

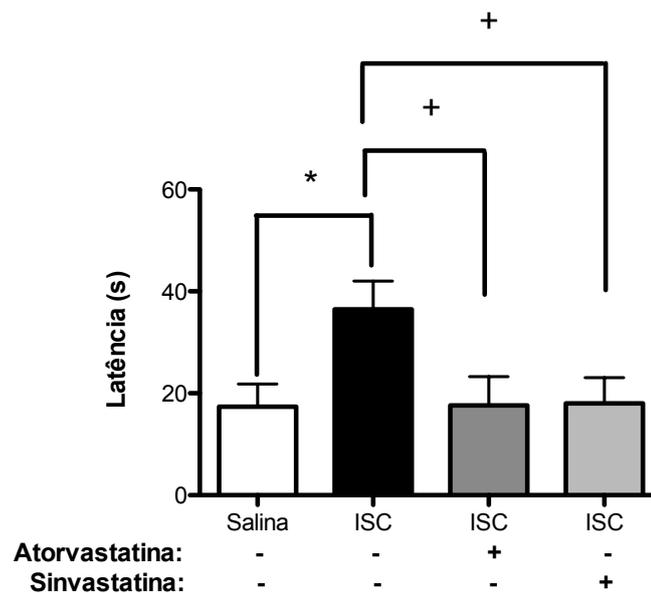


Figura 4.31. Avaliação de perda de memória espacial no modelo de labirinto aquático de Morris. No 4º dia de treinamento os animais (n=8-16/grupo) foram submetidos a sessão de treino e o tempo de latência na piscina até encontrarem a plataforma foi registrado (com um *cut-off* de 60 seg.) Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h (*p<0,05 vs. Salina; + p<0,05 vs. ISC, teste ANOVA com post-hoc teste de Tukey).

No quinto dia após o início dos treinamentos observamos que os animais ISC permaneceram significativamente menos tempo nadando no quadrante onde havia a plataforma em relação aos animais salina. O tratamento com as estatina aumentou significativamente o tempo em que os animais nadaram no quadrante em que ficava a plataforma em relação aos animais ISC (figura 4.32).

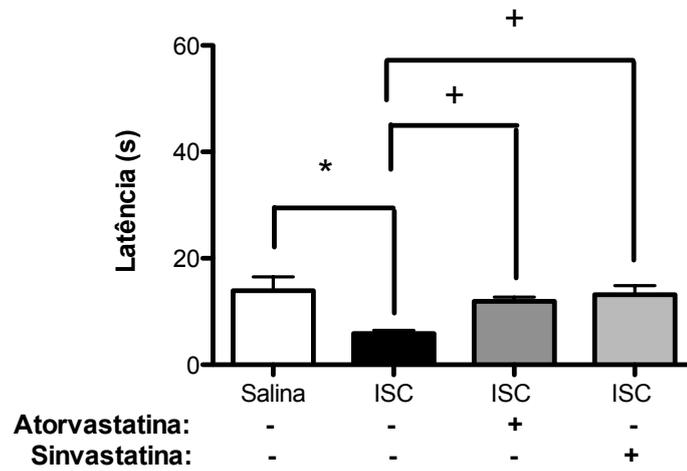


Figura 4.32. Avaliação de perda de memória espacial no modelo de labirinto aquático de Morris. No 5º dia de treinamento os animais (n=8-16/grupo) foram submetidos a sessão teste e o tempo de latência de nado no quadrante em que estava a plataforma foi registrado (com um *cut-off* de 60 seg.) Os animais foram tratados com atorvastatina ou sinvastatina (20 mg/kg) 1 hora antes da injeção do sobrenadante cecal, perdurando o tratamento concomitante a antibióticoterapia e reposição volêmica em 6, 24 e 48 h (* $p < 0,05$ vs. Salina; + $p < 0,05$ vs. ISC, teste ANOVA com post-hoc teste de Tukey).

5. DISCUSSÃO

A pesquisa básica e clínica realizada ao longo dos últimos anos produziu uma quantidade significativa de dados sobre os mecanismos imunoregulatórios, vasculares e endoteliais, assim como das alterações bioenergéticas, relacionadas a fisiopatologia da sepse (Schulte, W., *et al.*, 2013). Ainda que essas características fisiopatológicas não estejam totalmente elucidadas, há uma correlação direta entre a gravidade da sepse, o prognóstico e as disfunções orgânicas (Brealey, D., *et al.*, 2002).

Uma das grandes dificuldades no estudo da sepse está em transferir os achados experimentais para a clínica, assim como reproduzir achados clínicos em modelos experimentais (Dyson, A., Singer, M. 2009). Como os modelos existentes são muito heterogêneos, desenvolver novos modelos com ajustes finos na dinâmica do processo patológico, evitando possíveis vieses de interferência são essenciais para o melhor entendimento dos mecanismos desencadeados pela resposta inflamatória sistêmica, e suas consequências na disfunção dos órgãos, como o SNC, para uma melhor compreensão das disfunções fisiopatológicas, visando uma melhoria na capacidade de gerar novas terapias para sepse e a EAS.

Buscamos uma padronização do modelo de injeção do sobrenadante cecal (ISC) nos animais Swiss Webster. Esse modelo já foi utilizado em nosso laboratório, onde animais recebiam administração do sobrenadante cecal, por via intraperitoneal, e foram tratados com antibioticoterapia (Imipenem 10mg/kg de peso corporal). Os animais apresentaram altas taxas de mortalidade (acima de 60%) e os marcadores inflamatórios como as citocinas IL-1 β , IL-6 e MIP-1 α estavam aumentados. Foi observado também um aumento na peroxidação lipídica por espécies reativas de oxigênio no tecido cerebral. Além disso, foi observada a perda da capacidade cognitiva no modelo de avaliação de memória contextual de habituação em campo aberto (Carnevale, R. 2010).

Padronizamos o modelo de ISC para ser capaz de gerar um quadro de sepse moderada com taxas de mortalidade de aproximadamente 50% e que possibilitassem o desenvolvimento da EAS para a realização dos testes cognitivos após 15 dias da indução da sepse. Em modelos de endotoxemia com administração de LPS é observado que a quantidade de bactéria (*E.coli*) a ser administrada aos animais, é maior que 10⁶ UFC/ml (Bucklin, S.E., Morrison, D.C. 1996, Le Roy, D., *et al.*, 2001, Zimecki, M., *et al.*, 2004). No modelo de ISC padronizamos a quantidade de bactérias que foi administrada em cada animal (2x10⁹ UFC/animal), além de ajustarmos a antibioticoterapia para uma concentração de 30 mg/kg de peso

corporal e adicionamos 1 ml de salina para controle da volemia. Desta forma, observamos que o modelo foi capaz de reproduzir as taxas de mortalidade encontradas em modelos clássicos de sepse experimental (CLP) (Barichello, T., *et al.*, 2007). Essa taxa de mortalidade foi correlacionada aos parâmetros analisados pelo escore comportamental, o que nos permitiu confirmar a gravidade da doença de forma qualitativa e quantitativa.

Uma característica importante do modelo de ISC é a de não expor os animais a possíveis interferências de anestésicos, como a cetamina, que é um dos principais anestésicos utilizados em cirurgias de animais e em humanos, e que atua como antagonista dos receptores de glutamato do tipo NMDA (Driesen, N.R., *et al.*, 2013), induzindo delírio, convulsão e alterações no mecanismo de formação e consolidação de memória de curta e longa duração (Kohrs, R., Durieux, M.E. 1998). No modelo de ISC, os animais não passam pelo processo de cirurgia, que é característica do modelo de ligadura e punção cecal (CLP), o que poderia, assim, evitar taxas de mortalidade associadas ao processo cirúrgico (Kress, J.P. 2010).

Entre as disfunções fisiopatológicas ocasionadas pela resposta inflamatória na sepse, a disfunção cerebral é a que se apresenta mais precocemente e está diretamente relacionada a um pior prognóstico a curto e a longo prazo (Sharshar, T., *et al.*, 2007). A disfunção cerebral na sepse pode repercutir de diferentes formas na morbidade e mortalidade do paciente séptico. A EAS parece estar mais associada a distúrbios na auto regulação do que no fluxo cerebral (Pfister, D., *et al.*, 2008). Mais de 70% dos pacientes sépticos desenvolvem disfunções cerebrais potencialmente irreversíveis, caracterizadas pela diminuição sobretudo nos processos mentais, representados por déficit na capacidade de atenção, com diminuição aprendizado e na formação de memória de longo prazo, podendo causar ainda desorientação, *delirium* e coma (Semmler, A., *et al.*, 2008).

Nós também observamos, pela avaliação do teste de esQUIVA inibitória, que houve perda nos processos de memória de curta e longa duração, confirmando que o desenvolvimento de uma sepse moderada a grave pode levar a um quadro de déficit cognitivo. Nossos achados corroboram os dados já sugeridos em trabalhos da literatura, nos quais Barichello e cols. realizaram 3 testes cognitivos, sendo o primeiro deles o de esQUIVA inibitória nos animais 10 dias após a indução da sepse por CLP. Os animais sépticos tiveram um tempo de latência na plataforma menor que os animais controle (Barichello, T., *et al.*, 2005). Desta forma nossos achados corroboram os dados da literatura, indicando que a análise de dano cognitivo pode ser realizada no modelo de injeção do sobrenadante cecal.

As estatinas são inibidores da síntese do colesterol, e tem seu uso no tratamento e prevenção das doenças cardiovasculares ateroscleróticas bem relatado na literatura (Greenwood, J., *et al.*, 2006, Walter, D.H., *et al.*, 2004). Recentemente, diversos trabalhos foram realizados utilizando formas de tratamento que visam a redução dos danos fisiológicos e da mortalidade dos pacientes que desenvolvem EAS. Contudo, principalmente pela observação de efeitos pleiotrópicos, as estatinas vêm sendo usadas como drogas promissoras também em modelos experimentais de doenças inflamatórias sistêmicas como na malária (Reis, P.A., *et al.*, 2012), em doenças neurodegenerativas como Alzheimer (Barone, E., *et al.*, 2013), e em certos tipos de câncer (Ishikawa, S., *et al.*, 2013).

Estudos “in vitro” e em humanos demonstraram que, as estatinas apresentam complexos efeitos pleiotrópicos, incluindo os efeitos antiinflamatórios, imunomoduladores, de proteção a função endotelial e efeitos anticoagulantes. Esses efeitos pleiotrópicos foram descritos como ferramentas importantes para prevenir ou atenuar os múltiplos mecanismos fisiológicos no SNC gerados durante a resposta inflamatória, como a neuroinflamação, o dano a barreira hematoencefálica, sobre a apoptose neuronal, na isquemia, na hemorragia, na ativação de micróglia e no dano cognitivo (Morandi, A., *et al.*, 2011, Douma, T.N., *et al.*, 2011).

Nossos resultados mostram que o tratamento com sinvastatina e atorvastatina não foi capaz de produzir alterações significativas nas taxas de mortalidade gerada pela sepse no modelo ISC. A análise do escore comportamental mostrou que o tratamento com sinvastatina e atorvastatina reduziu a gravidade da sepse nos animais em 6, 24 e 48 h após injeção do sobrenadante cecal. Esses resultados podem indicar que mesmo apresentando efeitos regulatórios sobre a cascata inflamatória, amenizando assim os prejuízos fisiológicos ao organismo, as estatinas têm limitações em extinguir todo o dano causado pela inflamação sistêmica e a infecção.

As citocinas são os principais biomarcadores da sepse e representam valiosa ferramenta para delinear as diferentes origens da resposta imunológica (Cohen, J. 2002). A relação da concentração de citocinas e a gravidade da disfunção fisiológica aguda já foram descritas por nosso grupo em estudos anteriores. Observou-se que pacientes com sepse grave ou em choque séptico apresentaram relações diretas com citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF, MCP-1/CCL2, IFN- γ). Dentre estas citocinas, foi encontrado que IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1/CCL2 tinham correlação positiva com a disfunção dos órgãos característica da doença e que o aumento das concentrações de IL-6, IL-8 e G-CSF 24 h após o início da sepse

mostrou ser uma indicação da piora na disfunção, podendo levar a falência dos órgãos (Bozza, F.A., *et al.*, 2007). O tratamento com estatinas (cerivastatina) demonstrou ser eficaz na redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 em ratos no modelo de sepse por administração de LPS (Chaudhry, M.Z., *et al.*, 2008).

Observamos, pela análise do perfil de citocinas e quimiocinas, que o modelo ISC apresentou aumento nos níveis de IL-6 em 6 e 24 h no plasma, IL-1, KC/CXCL1 e MCP-1/CCL2 no plasma 24 h, e que o tratamento com sinvastatina e atorvastatina reduziu os níveis de IL-6 e IL-10 em 6 h e reduziu os níveis de IL-1, KC/CXCL1 e IL-6 em 24 h no plasma dos animais, corroborando com os achados de estudos anteriores que demonstraram no modelo de CLP que o tratamento com sinvastatina reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias (Calisto, K.L., *et al.*, 2010).

As manifestações neurológicas ocasionadas pela sepse e sepse grave são as formas mais comuns de encefalopatias nas unidades de terapia intensiva (Jacob A. *et al.*, 2011). A ocorrência de disfunção cerebral induzida pela sepse causa diretamente danos na homeostasia das funções do SNC (Semmler, A., *et al.*, 2008). O aumento da produção de IL-1 β e IL-6 contribuem para perpetuação do processo inflamatório no cérebro, com modificações de receptores e inibição da síntese de proteínas em vias de sinalização em regiões como hipocampo, importantes para o processo de aprendizado e memória (Betzen, C., *et al.*, 2009).

Neste trabalho, observamos que no modelo ISC houve aumento nas citocinas IL-6, IL-1, MCP-1/CCL2 e KC/CXCL1 em 6 e 24 h no cérebro e que o tratamento com sinvastatina e atorvastatina levou a uma redução significativa nos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e ainda gerou um aumento de IL-10 no cérebro em 6 h. Notamos ainda que ocorreu uma redução de IL-6 e MCP-1/CCL2 24 h após indução da sepse. Como já demonstrado na literatura, os inibidores da HMG-CoA redutase são capazes de inibir vias de sinalização pró-inflamatórias por supressão da ativação de TLR (TLR-2 e 4) (Lin, H., *et al.*, 2011, Wang, Y., *et al.*, 2011) regulando as vias de sinalização inflamatórias (Ni, X.Q., *et al.*, 2013) em doenças cardiovasculares. As estatinas também podem estar atenuando a regulação negativa da via dos PPARs, por parte de NF- κ B durante o processo inflamatório, o que também já foi descrito na literatura em estudos de hipertrofia miocárdica (Zou, C., *et al.*, 2013, Planavila, A., *et al.*, 2005)

A via de sinalização celular do NF- κ B, tem a atividade regulada pelas das pequenas GTPases como RHO, RAC ou RAS, o que é inativado pelas estatinas, com consequente diminuição da síntese de mediadores pró-inflamatórios como TNF-

α e IL-1 β . Isso nos permite sugerir que as estatinas podem exercer efeitos sobre as GTPases na redução da síntese das citocinas inflamatórias. Paralelamente a essa inativação as estatinas podem proteger a inativação de PPARs, o que favorece a redução da expressão e síntese dos mediadores pró-inflamatórios.

O aumento desses mediadores provoca o elevação na síntese de radicais livres (ROS/RNS), tanto pela ativação do complexo da NADPH oxidase quanto pela disfunção dos complexos I e IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondriais, (Halliwell, B. 2006). O aumento de NO e subsequentemente de ONOO⁻ induz rapidamente um decréscimo dos níveis de oxigênio para mitocôndria, o que desregula os complexos I e IV (Cassina, A.,Radi, R. 1996, Clementi, E., *et al.*, 1998). A redução na disponibilidade de O₂ leva a uma menor produção de ATP pela mitocôndria o que provoca prejuízo ao tecido cerebral (Halliwell, B. 2006). Com a desregulação dos complexos mitocondriais há o aumento da liberação de ânion superóxido, consequentemente com aumento do estresse oxidativo. Esse aumento já foi detectado no cérebro de ratos e porcos em modelo de sepse (Chuang, Y.C., *et al.*, 2002, Deutschman, C.S., *et al.*, 1990).

O estresse oxidativo que inicialmente é promovido pelos fagócitos em virtude da necessidade de erradicar os patógenos invasores, também provoca a oxidação de cadeias de ácidos graxos polinsaturados, processo conhecido como peroxidação lipídica (Boueiz, A.,Hassoun, P.M. 2009). Esse processo dá origem a produtos derivados de aldeído reativos, como o MDA, que pertence a um grupo de substâncias reativas ao TBARs (Moore, K.,Roberts, L.J., 2nd 1998).

Analizamos os níveis de MDA no tecido cerebral dos animais e observamos que houve um aumento proporcionado pelo modelo ISC nas primeiras 6 h. Contudo não observamos qualquer alteração 24 h após indução da sepse. Nossos resultados são compatíveis com achados da literatura em que os níveis aumentados de MDA foram descritos nas fases iniciais da sepse (Barichello, T., *et al.*, 2006). No entanto, alguns estudos verificaram um aumento nos níveis de MDA em fases mais tardias (48h) (Ninkovic, M.B., *et al.*, 2009), 10 dias (Comim, C.M., *et al.*, 2011) e após 60 dias da indução da sepse (Steckert, A.V., *et al.*, 2013). Observamos que o tratamento com sinvastatina e atorvastatina reduziu os níveis de MDA 6 h após a injeção do sobrenadante cecal, sugerindo que as estatinas podem reduzir a ativação de NADPH oxidase por esse complexo possuir como proteína acopladora a pequena GTPase. Como citado anteriormente as estatinas modulam ativação de Ras, o que reduziria a atividade do complexo enzimático. Com isso, as estatinas reduziriam

ROS/RNS, diminuindo a peroxidação lipídica e os danos causados pelo estresse oxidativo no tecido cerebral.

Os mediadores pró-inflamatórias como as citocinas, as cininas (bradicinina), além das moléculas do sistema complemento, têm a síntese e liberação aumentada na EAS, e em associação com estresse oxidativo e peroxidação lipídica, são descritas como responsáveis pela disfunção na BHE na sepse (Eckman, P.L., *et al.*, 1958, Esen, F., *et al.*, 2005, Flierl, M.A., *et al.*, 2010). Um estudo realizado em modelo de CLP em camundongos observou o aumento na permeabilidade da BHE, através dos métodos de fluorescência e colorimétrico (Yokoo, H., *et al.*, 2012). Outro estudo, realizado com ratos Wistar também submetidos ao modelo de CLP, houve um aumento da permeabilidade da BHE principalmente no córtex e hipocampo (Dal-Pizzol, F., *et al.*, 2013). No presente trabalho observamos um aumento da permeabilidade da BHE no modelo ISC e o tratamento com sinvastatina e atorvastatina não conferiu proteção a BHE quando analisamos a quantificação pelo método colorimétrico utilizando azul de Evans. Isso nos sugere que provavelmente a proteção gerada pelas estatinas deve ser originada sobre as vias de sinalização intracelular.

Essa disfunção provocada sobre a BHE é resultado da ativação das células endoteliais, que também levam a disfunção microcirculatória, com comprometimento na perfusão cerebral (Sonneville, R., *et al.*, 2013). A técnica de microscopia intravital tem demonstrado que além da lesão causada pela isquemia cerebral propriamente dita, danos teciduais decorrentes da reperfusão e reoxigenação do órgão isquêmico estão envolvidos (Menger, M.D., *et al.*, 1999). A microcirculação da membrana *pia mater* forma uma complexa rede vascular na superfície cerebral, nutrindo as camadas superficiais do córtex cerebral e está profundamente envolvida nas alterações microvasculares decorrentes da lesão causada pela isquemia e reperfusão cerebral (Lapi, D., *et al.*, 2008). A redução do diâmetro arteriolar causada pela lesão endotelial vascular leva a redução do fluxo sanguíneo local e conseqüentemente, menor recrutamento capilar, caracterizando a rarefação capilar funcional. No entanto, o restabelecimento desta está paradoxalmente associado a aumento da adesão de leucócitos na parede endotelial de vênulas pós-capilares com subsequente ativação dos leucócitos. Esse processo causa a obstrução de microvasos, exacerba a injúria das células endoteliais vasculares, com dano as tight-junctions, tornando o endotélio menos responsivo ao estímulo vascular (Menger, M.D., *et al.*, 1992).

Conforme verificado por Araujo e cols a alteração microvascular no cérebro produz redução da densidade capilar funcional e aumento do fluxo sanguíneo em animais sépticos, caracterizado pelo fechamento capilar ou perfusão intermitente dos capilares (Araujo, C.V., *et al.*, 2012). Além disso, em estudo realizado com camundongos no modelo de CLP observou-se por análise de ressonância magnética, a presença de edema citotóxico no hipocampo e no córtex, assim como dano neuronal em associação a danos a BHE (Bozza, F.A., *et al.*, 2010).

No modelo de administração de conteúdo fecal em ovelhas, foi observado uma redução da densidade total de perfusão dos vasos no cérebro, com perda da densidade capilar, da proporção de perfusão dos pequenos vasos e do número total de capilares perfundidos em 6 e 12 h após indução da sepse (Taccone, F.S., *et al.*, 2010). Demonstramos que não houve diferença na quantificação da densidade capilar 6 h após injeção do sobrenadante cecal, entretanto em 24 h observamos que ocorreu uma redução na densidade capilar no modelo ISC e o tratamento com atorvastatina conferiu uma proteção a perda da densidade capilar funcional. Observamos ainda que, em 6 h, o tratamento com atorvastatina preservou a responsividade das células endoteliais ao estímulo com acetilcolina e o mesmo padrão foi observado em 24 h com a sinvastatina. Esses dados podem sugerir que as estatinas reduzem o efeito da inflamação sobre a microvasculatura cerebral, conferindo a manutenção do fluxo sanguíneo capilar.

O dano provocado a BHE aumenta a permeabilidade das moléculas do meio extracelular para o SNC. O perfil do fluxo laminar na microcirculação culmina na geração de forças de turbilhonamento lateral que permitem aos leucócitos interagirem com as células endoteliais (Russell, J., *et al.*, 2003). Um parâmetro importante na alteração da densidade capilar e no fluxo sanguíneo no interior dos capilares, arteríolas e vênulas é a aderência de polimorfonucleares como os neutrófilos as células endoteliais, provocando liberação de radicais livres e proteases (Hildebrand, F., *et al.*, 2005).

O bloqueio do recrutamento leucocitário representa uma condição significativamente benéfica para o desenvolvimento da fisiopatologia da sepse e da EAS (Bauer, P., *et al.*, 2000). Já foi demonstrado, em modelo experimental de SIRS induzida por LPS, que houve um maior recrutamento de leucócitos ativados da circulação sistêmica para a microvasculatura cerebral (Zhou, H., *et al.*, 2009). A adesão de leucócitos aumenta minutos após a reperfusão, e permanece aumentada por horas (Harris, A.G., *et al.*, 1996). Nosso grupo demonstrou que o tratamento com agonistas de PPAR γ inibiu o rolamento e a adesão de leucócitos, assim como, a

rarefação capilar em camundongos sépticos (Araujo, C.V., *et al.*, 2012). Os dados obtidos no presente trabalho corroboram esses achados anteriores, sendo o modelo de ISC capaz de gerar um aumento da adesão e rolamento de leucócitos 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal. O tratamento com sinvastatina e atorvastatina conferiu uma redução na adesão e no rolamento de leucócitos em 6 h, e a sinvastatina demonstrou ser eficaz na diminuição do rolamento em 24 h após indução da sepse no modelo ISC. Assim, podemos sugerir que o tratamento com as estatinas parece desempenhar um papel protetor sobre as células endoteliais e sobre densidade capilar funcional na microcirculação cerebral. Isso é de extrema importância para a redução da hipóxia, mantendo a perfusão do tecido cerebral. Conjuntamente com a proteção a funcionalidade microvascular notamos que as estatinas produziram uma menor adesão e rolamento de leucócitos, proporcionando um menor prejuízo ao SNC, o que é fundamental para a manutenção do fluxo capilar normal e a homeostase neuronal.

Os neutrófilos são as primeiras células do sistema imune inato a serem ativadas desempenhando um importante papel antimicrobica. Os neutrófilos apresentam dois mecanismos antimicrobianos categorizados como oxidativos e não-oxidativos (Hampton, M.B., *et al.*, 1998). A ativação dos neutrófilos leva ao aumento do consumo de oxigênio, que é convertido pela NADPH oxidase ao ânion superóxido, precursor de ROS como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Hirche, T.O., *et al.*, 2005). O mecanismo não-oxidativo é marcado pela degranulação, com a liberação da enzima MPO, que utiliza H_2O_2 e íons cloro para síntese de ácido hipocloroso, que é altamente citotóxico aos patógenos (Ganz, T. 1999).

Existem evidências sugerindo que a MPO desempenhe um papel no dano tecidual em patologias inflamatórias como a sepse (Gaut, J.P., *et al.*, 2001). Comim e cols. demonstraram que no modelo de CLP os animais com sepse apresentaram níveis mais elevados de MPO no cérebro, sendo esse aumento mais pronunciado em 24 h após indução da sepse (Comim, Vilela *et al.* 2011). Em um trabalho anterior realizado em nosso laboratório no modelo de CLP, verificou-se que havia um aumento na adesão e rolamento de leucócitos na microvasculatura cerebral, com maior atividade de MPO mais marcante após 24 h da indução da sepse (Araujo, C.V., *et al.*, 2012). No presente estudo observamos um aumento nos níveis de MPO no modelo ISC 6 e 24 h após injeção do sobrenadante cecal. Verificamos que o tratamento com as estatinas reduziu os níveis em 6 e 24 h após indução da sepse. Essa diminuição pode indicar que as estatinas atenuam o recrutamento e a

degranulação dos neutrófilos no cérebro dos animais no modelo de ISC, reduzindo os efeitos deletérios do excesso de MPO.

Os mediadores inflamatórios produzem mudanças comportamentais durante as infecções, sinalizando ao cérebro por alterações adaptativas, reorganizando prioridades e preservando energia para o controle da infecção, suprimindo atividades motoras e sociais (Cunningham, C. 2013). As microglias são os macrófagos do tecido cerebral que podem ser ativadas a partir de um estado de repouso, por mecanismos patogênicos, e estímulos exógenos e desempenham a função de controle da infecção e inflamação (Lemstra, A.W., *et al.*, 2007, Wake, H., *et al.*, 2011). A ativação da microglia tem um papel crucial no *clearance* da proteína β -amilóide na doença de Alzheimer (DeWitt, D.A., *et al.*, 1998).

Entretanto, a ativação crônica da microglia produz efeitos na mediação da disfunção e do dano neuronal em infecções sistêmicas. Em um modelo de neurodegeneração crônica, a exposição ao LPS provocou ativação da microglia, com aumento da expressão de IL-1, IL-6, TNF- α e iNOS, ocasionando a morte neuronal (Morandi, A., *et al.*, 2011). A redução na ativação da microglia diminui a gravidade e demonstra haver o envolvimento desse tipo celular com o dano ocasionado ao SNC durante a esclerose múltipla (Zindler, E., Zipp, F. 2010). Nossos resultados mostram que o modelo de ISC produziu aumento na ativação da microglia nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo em 6 h após indução da sepse. Observamos que tratamento com sinvastatina e atorvastatina não foi capaz de reverter a ativação, mas provocou alterações morfológicas da microglia nas regiões CA1, e GD. Contudo, o tratamento com sinvastatina reduziu a ativação da microglia na região CA3 no hipocampo dos animais.

Essa inibição da ativação pode representar um efeito protetor as células neuronais, visto que ocorrerá menor síntese de moléculas inflamatórias e ROS por parte da microglia. Já foi descrito que o tratamento com estatinas pode reverter esses efeitos deletérios associados com ativação da microglia, promovendo um aumento da síntese de BDNF, redução do *delirium* e da perda de memória de longa duração (Morandi, A., *et al.*, 2011). As estatinas podem mediar uma inibição na atividade da NADPH oxidase, visto que as isoformas NOX2 e NOX4 já foram descritas como a fonte majoritária de estresse oxidativo no tecido cerebral (Cooney, S.J., *et al.*, 2013)

Em modelo experimental de sepse por administração de LPS, verificou-se que o efeito inflamatório no SNC, com ativação da microglia, gera além da morte neuronal distúrbios na capacidade cognitiva, com alterações na transmissão pré e

pós-sinápticas dos animais (Semmler, A., *et al.*, 2007, Semmler, A., *et al.*, 2005, Weberpals, M., *et al.*, 2009). Na transmissão sináptica normal, a chegada de um potencial e ação estimula os receptores do glutamato tipo AMPA, ativando influxo de sódio e despolarizando a célula com ativação subsequente dos receptores NMDA. Com isso, ocorre maior influxo de cálcio com aumento da expressão de mais receptores, possibilitando a formação de uma potenciação de longa duração (LTP) (Lanni, C., *et al.*, 2008). Alguns estudos indicam que esse fenômeno é responsável pelo armazenamento das memórias na região do hipocampo (Bliss, T.V., Lomo, T. 1973).

As memórias não são obtidas no seu formato final depois da exposição ao estímulo sensorial. Durante os primeiros minutos ou as primeiras horas após sua aquisição, elas são suscetíveis, por exemplo, a outros estímulos sensoriais ou o efeito gerado pela administração de drogas, e com isso, podem sofrer perturbações no processo de consolidação (McGaugh, J.L. 1966). Para que ocorra a formação de uma memória definitiva, ou seja, para formação da memória de longa duração (LTM), é necessário que haja um sistema primário de recordação por tempo suficiente para gerar a LTM. Esse processo primário, conhecido como memória de curta duração (STM) (Davis, H.P., *et al.*, 1976, Vianna, M.R., *et al.*, 2000).

Esses processos de formação de memória STM e LTM apresentam características comuns, como a ativação na região CA1 do hipocampo de receptores NMDA, além de receptores colinérgicos muscarínicos, dopaminérgicos (D1) e β -adrenérgicos que atuam como neurotransmissores moduladores do processo. Entretanto existem diferenças entre ambos os processos, sendo que na formação de LTM, ocorre estimulação de fosfoquinases como PKA e PKCs, óxido nítrico sintetase, heme-oxigenase, cálcio-calmodulina quinase (CAMKII), síntese proteica e ativação de proteínas nucleares como CREB no hipocampo. Estes últimos processos não ocorrem durante a formação da STM. Associado a esse processo, é produzido um aumento de fatores neurotróficos como BDNF que promove a sobrevivência neuronal, diferenciação e regulação da transmissão e plasticidade sinápticas (Izquierdo, I., Medina, J.H. 1997, Izquierdo, I., *et al.*, 1998).

Observamos pelo teste de esQUIVA inibitória, que o modelo ISC provocou uma perda de memória de curta e de longa duração nos animais 15 dias após indução da sepse. O tratamento com sinvastatina e atorvastatina conferiu proteção a formação da memória aversiva. Além disso, verificamos que no modelo ISC os animais apresentaram dano a capacidade cognitiva na avaliação da memória espacial pelo teste de Morris *water maze* após 15 dias da injeção do sobrenadante cecal. O

tratamento com sinvastatina e atorvastatina foi eficaz no teste de memória espacial realizado no labirinto aquático de Morris no 5^o dia após início do teste, produzindo um aumento na capacidade de memória espacial nos animais. Esses resultados sugerem que o modelo ISC se mostrou eficaz para o estudo do déficit cognitivo resultante da sepse e as estatinas reduziram os efeitos da inflamação em diferentes regiões cerebrais, como hipocampo (dorsal, ventral e medial), córtex entorrinal e amígdala basolateral, possibilitando aos animais a manutenção das memórias.

Os resultados obtidos com o uso da estatina, como um possível alvo terapêutico na prevenção de dano cognitivo gerado por doenças inflamatórias como a sepse, corroboram os dados observados na literatura. A sinvastatina e a atorvastatina aumentaram a formação de memória espacial no teste do labirinto aquático de Morris, em modelo de injúria traumática cerebral (Lu, D., *et al.*, 2007). A sinvastatina produziu aumento do aprendizado e memória em animais-controle no teste de habituação em campo aberto em ratos que sofreram uma completa extração do bulbo olfatório (Douma, T.N., *et al.*, 2011). Num modelo de doença de Alzheimer observou-se que a sinvastatina aumentou a potenciação de longa duração (LTP) em camundongos (Mans, R.A., *et al.*, 2010).

Em um trabalho anteriormente realizado em nosso laboratório, Reis e cols., observaram que no modelo experimental de malária cerebral o tratamento com lovastatina preveniu a neuroinflamação, com redução da expressão de mediadores inflamatórios, e proteção a BHE. Além disso, verificaram um menor rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral, com proteção a formação de memória de curta e longa duração (Reis, P.A., *et al.*, 2012). No presente trabalho, o tratamento com as estatinas demonstrou ser uma possível terapia adjuvante na sepse, reduzindo a síntese e expressão dos mediadores inflamatórios, protegendo o SNC dos efeitos deletérios dessas moléculas, conferindo proteção ao processo de formação e consolidação de memórias.

6. CONCLUSÃO

O modelo experimental de injeção do sobrenadante cecal (ISC) foi capaz de reproduzir as taxas de mortalidade semelhantes as encontradas na clínica, demonstrando que pode ser utilizado como modelo experimental de sepse;

A avaliação do escore de gravidade no modelo de ISC nos permitiu padronizar um quadro de sepse moderada;

O modelo de ISC apresentou déficit cognitivo ao teste de esQUIVA inibitória, mostrando que pode ser utilizado como modelo experimental de EAS seguido de comprometimento cognitivo;

O tratamento com as estatinas foi capaz de diminuir os níveis das citocinas pró-inflamatórias MCP-1/CCL2 e KC/CXCL1, IL1b e IL-6 no cérebro dos animais mostrando um possível papel anti-inflamatório da droga no modelo aplicado;

O tratamento com as estatinas foi capaz de reduzir os níveis de MDA e de MPO no cérebro dos animais sugerindo um papel sobre o estresse oxidativo e na ativação de neutrófilos;

O tratamento com sinvastatina foi capaz de reduzir a ativação da micróglia na região CA3 do hipocampo dos animais;

O tratamento com as estatinas foi capaz de proteger a microcirculação cerebral da rarefação capilar funcional e da adesão e rolamento de leucócitos com uma proteção a resposta endotelial;

O tratamento com as estatinas foi capaz de proteger contra o dano cognitivo nos testes de esQUIVA inibitória e do labirinto aquático de Morris.

Nossos achados demonstram que o tratamento com as estatinas no modelo de ISC demonstrou ser uma promissora terapia contra os danos causados a função endotelial vascular cerebral. Níveis reduzidos de mediadores inflamatórios, associados a redução do acúmulo de leucócitos e de estresse oxidativo favoreceu a proteção das memórias aversivas e espaciais nos animais. Nosso estudo evidencia novos alvos terapêuticos para a sepse e encefalopatia associada a sepse.

7. Referencias Bibliográficas

- Abbott, N.J., Ronnback, L., Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews Neuroscience*. 2006;7(1):41-53. Epub 2005/12/24.
- Adam, N., Kandelman, S., Mantz, J., Chretien, F., Sharshar, T. Sepsis-induced brain dysfunction. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(2):211-21. Epub 2013/02/16.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801. Epub 2006/02/25.
- Akrout, N., Sharshar, T., Annane, D. Mechanisms of brain signaling during sepsis. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7(4):296-301. Epub 2010/06/02.
- Alberti, C., Brun-Buisson, C., Burchardi, H., Martin, C., Goodman, S., Artigas, A., Sicignano, A., Palazzo, M., Moreno, R., Boulme, R., Lepage, E., Le Gall, R. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive care medicine*. 2002;28(2):108-21. Epub 2002/03/22.
- Almog, Y. Statins, inflammation, and sepsis: hypothesis. *Chest*. 2003;124(2):740-3. Epub 2003/08/09.
- Alves-Filho, J.C., Benjamim, C., Tavares-Murta, B.M., Cunha, F.Q. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100 Suppl 1:223-6. Epub 2005/06/18.
- Alves-Filho, J.C., de Freitas, A., Spiller, F., Souto, F.O., Cunha, F.Q. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock*. 2008;30 Suppl 1:3-9. Epub 2008/08/16.
- Angus, D.C., van der Poll, T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840-51. Epub 2013/08/30.
- Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., Pinsky, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29(7):1303-10. Epub 2001/07/11.
- Araujo, C.V., Estado, V., Tibirica, E., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., Silva, A.R. PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. *Microvasc Res*. 2012;84(2):218-21. Epub 2012/06/05.
- Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*. 1994;55:97-179. Epub 1994/01/01.
- Barichello, T., Martins, M.R., Reinke, A., Feier, G., Ritter, C., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 2005;33(1):221-3; discussion 62-3. Epub 2005/01/13.
- Barichello, T., Fortunato, J.J., Vitali, A.M., Feier, G., Reinke, A., Moreira, J.C., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 2006;34(3):886-9. Epub 2006/03/01.

Barichello, T., Martins, M.R., Reinke, A., Constantino, L.S., Machado, R.A., Valvassori, S.S., Moreira, J.C., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(6):831-7. Epub 2007/06/22.

Barone, E., Di Domenico, F., Butterfield, D.A. Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer disease: Their pleiotropic functions as potential therapeutic targets. *Biochemical pharmacology.* 2013. Epub 2013/11/16.

Bauer, P., Lush, C.W., Kvietys, P.R., Russell, J.M., Granger, D.N. Role of endotoxin in the expression of endothelial selectins after cecal ligation and perforation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278(5):R1140-7. Epub 2000/05/09.

Benjamim, C.F., Silva, J.S., Fortes, Z.B., Oliveira, M.A., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun.* 2002;70(7):3602-10. Epub 2002/06/18.

Berg, D.J., Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, W., Menon, S., Davidson, N., Grunig, G., Rennick, D. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *The Journal of clinical investigation.* 1995;96(5):2339-47. Epub 1995/11/01.

Berg, R.M., Moller, K., Bailey, D.M. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2011;31(7):1532-44. Epub 2011/04/14.

Betzen, C., White, R., Zehendner, C.M., Pietrowski, E., Bender, B., Luhmann, H.J., Kuhlmann, C.R. Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(8):1212-20. Epub 2009/08/08.

Blackwell, T.S., Christman, J.W. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth.* 1996;77(1):110-7. Epub 1996/07/01.

Bliss, T.V., Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology.* 1973;232(2):331-56. Epub 1973/07/01.

Bolton, C.F., Young, G.B., Zochodne, D.W. The neurological complications of sepsis. *Annals of neurology.* 1993;33(1):94-100. Epub 1993/01/01.

Bone, R.C. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6(1):57-68. Epub 1993/01/01.

Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., Sibbald, W.J. 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.* 1992;101(6):1644-55. Epub 1992/06/01.

Bossink, A.W., Paemen, L., Jansen, P.M., Hack, C.E., Thijs, L.G., Van Damme, J. Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1 and -2 are elevated in human sepsis. *Blood.* 1995;86(10):3841-7. Epub 1995/11/15.

Boueiz, A., Hassoun, P.M. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvascular research*. 2009;77(1):26-34. Epub 2008/12/02.

Bozza, F.A., D'Avila, J.C., Ritter, C., Sonnevile, R., Sharshar, T., Dal-Pizzol, F. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. *Shock*. 2013;39 Suppl 1:10-6. Epub 2013/03/14.

Bozza, F.A., Salluh, J.I., Japiassu, A.M., Soares, M., Assis, E.F., Gomes, R.N., Bozza, M.T., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care*. 2007;11(2):R49. Epub 2007/04/24.

Bozza, F.A., Garteiser, P., Oliveira, M.F., Doblaz, S., Cranford, R., Saunders, D., Jones, I., Towner, R.A., Castro-Faria-Neto, H.C. Sepsis-associated encephalopathy: a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30(2):440-8. Epub 2009/10/22.

Brealey, D., Brand, M., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., Smolenski, R., Davies, N.A., Cooper, C.E., Singer, M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*. 2002;360(9328):219-23. Epub 2002/07/23.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5. Epub 2004/03/06.

Brown, A.M., Ransom, B.R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*. 2007;55(12):1263-71. Epub 2007/07/31.

Brown, R.C., Morris, A.P., O'Neil, R.G. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res*. 2007;1130(1):17-30. Epub 2006/12/16.

Bucklin, S.E., Morrison, D.C. Bacteremia versus endotoxemia in experimental mouse leukopenia--role of antibiotic chemotherapy. *The Journal of infectious diseases*. 1996;174(6):1249-54. Epub 1996/12/01.

Burchardi, H., Schneider, H. Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics*. 2004;22(12):793-813. Epub 2004/08/06.

Calisto, K.L., Carvalho Bde, M., Ropelle, E.R., Mittestainer, F.C., Camacho, A.C., Guadagnini, D., Carvalheira, J.B., Saad, M.J. Atorvastatin improves survival in septic rats: effect on tissue inflammatory pathway and on insulin signaling. *PLoS One*. 2010;5(12):e14232. Epub 2010/12/15.

Car, B.D., Meloni, F., Luisetti, M., Semenzato, G., Gialdrone-Grassi, G., Walz, A. Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149(3 Pt 1):655-9. Epub 1994/03/01.

Carnevale, R. Encefalopatia associada a sepse: disfunção comportamental, metabólica, mitocondrial em modelo de sepse abdominal. Rio de Janeiro 2010.

Carvalho-Tavares, J., Hickey, M.J., Hutchison, J., Michaud, J., Sutcliffe, I.T., Kubes, P. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res.* 2000;87(12):1141-8. Epub 2000/01/11.

Cassina, A., Radi, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Archives of biochemistry and biophysics.* 1996;328(2):309-16. Epub 1996/04/15.

Chaudhry, M.Z., Wang, J.H., Blankson, S., Redmond, H.P. Statin (cerivastatin) protects mice against sepsis-related death via reduced proinflammatory cytokines and enhanced bacterial clearance. *Surg Infect (Larchmt).* 2008;9(2):183-94. Epub 2008/04/23.

Chuang, Y.C., Tsai, J.L., Chang, A.Y., Chan, J.Y., Liou, C.W., Chan, S.H. Dysfunction of the mitochondrial respiratory chain in the rostral ventrolateral medulla during experimental endotoxemia in the rat. *Journal of biomedical science.* 2002;9(6 Pt 1):542-8. Epub 2002/10/10.

Clarke, J.R., Cammarota, M., Gruart, A., Izquierdo, I., Delgado-Garcia, J.M. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(6):2652-7. Epub 2010/02/06.

Clementi, E., Brown, G.C., Feelisch, M., Moncada, S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998;95(13):7631-6. Epub 1998/06/24.

Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420(6917):885-91. Epub 2002/12/20.

Comim, C.M., Cassol-Jr, O.J., Constantino, L.S., Felisberto, F., Petronilho, F., Rezin, G.T., Scaini, G., Daufenbach, J.F., Streck, E.L., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochemical research.* 2011;36(2):304-11. Epub 2010/11/26.

Cooney, S.J., Bermudez-Sabogal, S.L., Byrnes, K.R. Cellular and temporal expression of NADPH oxidase (NOX) isoforms after brain injury. *Journal of neuroinflammation.* 2013;10(1):155. Epub 2013/12/19.

Cross, A.R., Segal, A.W. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et biophysica acta.* 2004;1657(1):1-22. Epub 2004/07/09.

Cunningham, C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia.* 2013;61(1):71-90. Epub 2012/06/08.

d'Avila, J.C., Santiago, A.P., Amancio, R.T., Galina, A., Oliveira, M.F., Bozza, F.A. Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Crit Care Med.* 2008;36(6):1925-32. Epub 2008/05/23.

Dal-Pizzol, F., Rojas, H.A., Dos Santos, E.M., Vuolo, F., Constantino, L., Feier, G., Pasquali, M., Comim, C.M., Petronilho, F., Gelain, D.P., Quevedo, J., Moreira, J.C., Ritter, C. Matrix Metalloproteinase-2 and Metalloproteinase-9 Activities are Associated with Blood-Brain Barrier Dysfunction in an Animal Model of Severe Sepsis. *Mol Neurobiol.* 2013;48(1):62-70. Epub 2013/03/13.

Darwish, I., Liles, W.C. Emerging therapeutic strategies to prevent infection-related microvascular endothelial activation and dysfunction. *Virulence.* 2013;4(6):572-82. Epub 2013/07/19.

Davis, H.P., Spanis, C.W., Squire, L.R. Inhibition of cerebral protein synthesis: performance at different times after passive avoidance training. *Pharmacology, biochemistry, and behavior.* 1976;4(1):13-6. Epub 1976/01/01.

Deutschman, C.S., Kirsch, J.R., Breslow, M.J., Miller, C.F., Traystman, R.J. Failure of endotoxic shock to elicit superoxide anion production in pig brain. *Circulatory shock.* 1990;31(2):149-58. Epub 1990/06/01.

DeWitt, D.A., Perry, G., Cohen, M., Doller, C., Silver, J. Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Experimental neurology.* 1998;149(2):329-40. Epub 1998/03/17.

Doble, A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacology & therapeutics.* 1999;81(3):163-221. Epub 1999/05/20.

Doerschug, K.C., Delsing, A.S., Schmidt, G.A., Haynes, W.G. Impairments in microvascular reactivity are related to organ failure in human sepsis. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2007;293(2):H1065-71. Epub 2007/05/08.

Douma, T.N., Borre, Y., Hendriksen, H., Olivier, B., Oosting, R.S. Simvastatin improves learning and memory in control but not in olfactory bulbectomized rats. *Psychopharmacology.* 2011;216(4):537-44. Epub 2011/03/09.

Driesen, N.R., McCarthy, G., Bhagwagar, Z., Bloch, M.H., Calhoun, V.D., D'Souza, D.C., Gueorguieva, R., He, G., Leung, H.C., Ramani, R., Anticevic, A., Suckow, R.F., Morgan, P.T., Krystal, J.H. The Impact of NMDA Receptor Blockade on Human Working Memory-Related Prefrontal Function and Connectivity. *Neuropsychopharmacology.* 2013. Epub 2013/07/17.

Dyson, A., Singer, M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med.* 2009;37(1 Suppl):S30-7. Epub 2009/01/06.

Eccles, K.A., Sowden, H., Porter, K.E., Parkin, S.M., Homer-Vanniasinkam, S., Graham, A.M. Simvastatin alters human endothelial cell adhesion molecule expression and inhibits leukocyte adhesion under flow. *Atherosclerosis.* 2008;200(1):69-79. Epub 2008/05/20.

Eckman, P.L., King, W.M., Brunson, J.G. Studies on the blood brain barrier. I. Effects produced by a single injection of gramnegative endotoxin on the permeability of the cerebral vessels. *The American journal of pathology*. 1958;34(4):631-43. Epub 1958/07/01.

Eddleston, M., Mucke, L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*. 1993;54(1):15-36. Epub 1993/05/01.

Esen, F., Erdem, T., Aktan, D., Orhan, M., Kaya, M., Eraksoy, H., Cakar, N., Telci, L. Effect of magnesium sulfate administration on blood-brain barrier in a rat model of intraperitoneal sepsis: a randomized controlled experimental study. *Crit Care*. 2005;9(1):R18-23. Epub 2005/02/08.

Fanning, N.F., Porter, J., Shorten, G.D., Kirwan, W.O., Bouchier-Hayes, D., Cotter, T.G., Redmond, H.P. Inhibition of neutrophil apoptosis after elective surgery. *Surgery*. 1999;126(3):527-34. Epub 1999/09/16.

Flierl, M.A., Rittirsch, D., Huber-Lang, M.S., Stahel, P.F. Pathophysiology of septic encephalopathy--an unsolved puzzle. *Crit Care*. 2010;14(3):165. Epub 2010/06/23.

Foxman, E.F., Campbell, J.J., Butcher, E.C. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *The Journal of cell biology*. 1997;139(5):1349-60. Epub 1998/01/07.

Freund, H.R., Muggia-Sullam, M., Peiser, J., Melamed, E. Brain neurotransmitter profile is deranged during sepsis and septic encephalopathy in the rat. *The Journal of surgical research*. 1985;38(3):267-71. Epub 1985/03/01.

Gabay, C., Smith, M.F., Eidlen, D., Arend, W.P. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(12):2930-40. Epub 1997/06/15.

Galley, H.F., Davies, M.J., Webster, N.R. Ascorbyl radical formation in patients with sepsis: effect of ascorbate loading. *Free radical biology & medicine*. 1996;20(1):139-43. Epub 1996/01/01.

Ganz, T. Oxygen-independent microbicidal mechanisms of phagocytes. *Proceedings of the Association of American Physicians*. 1999;111(5):390-5. Epub 1999/10/16.

Gardiner, E.E., Andrews, R.K. Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection-related vascular dysfunction. *Blood Rev*. 2012;26(6):255-9. Epub 2012/10/02.

Gasparini, C.F., Griffiths, L.R. The biology of the glutamatergic system and potential role in migraine. *Int J Biomed Sci*. 2013;9(1):1-8. Epub 2013/05/16.

Gaut, J.P., Yeh, G.C., Tran, H.D., Byun, J., Henderson, J.P., Richter, G.M., Brennan, M.L., Lusic, A.J., Belaouaj, A., Hotchkiss, R.S., Heinecke, J.W. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(21):11961-6. Epub 2001/10/11.

Gavillet, M., Allaman, I., Magistretti, P.J. Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia*. 2008;56(9):975-89. Epub 2008/04/03.

- Giulian, D. Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. *Glia*. 1993;7(1):102-10. Epub 1993/01/01.
- Gogos, C.A., Drosou, E., Bassaris, H.P., Skoutelis, A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *The Journal of infectious diseases*. 2000;181(1):176-80. Epub 1999/12/23.
- Gomes, R.N., Teixeira-Cunha, M.G., Figueiredo, R.T., Almeida, P.E., Alves, S.C., Bozza, P.T., Bozza, F.A., Bozza, M.T., Zimmerman, G.A., Castro-Faria-Neto, H.C. Bacterial clearance in septic mice is modulated by MCP-1/CCL2 and nitric oxide. *Shock*. 2013;39(1):63-9. Epub 2012/12/19.
- Gomez-Jimenez, J., Martin, M.C., Sauri, R., Segura, R.M., Esteban, F., Ruiz, J.C., Nuvials, X., Boveda, J.L., Peracaula, R., Salgado, A. Interleukin-10 and the monocyte/macrophage-induced inflammatory response in septic shock. *The Journal of infectious diseases*. 1995;171(2):472-5. Epub 1995/02/01.
- Gordon, S.M., Jackson, J.C., Ely, E.W., Burger, C., Hopkins, R.O. Clinical identification of cognitive impairment in ICU survivors: insights for intensivists. *Intensive care medicine*. 2004;30(11):1997-2008. Epub 2004/11/19.
- Granja, C., Lopes, A., Moreira, S., Dias, C., Costa-Pereira, A., Carneiro, A. Patients' recollections of experiences in the intensive care unit may affect their quality of life. *Crit Care*. 2005;9(2):R96-109. Epub 2005/03/19.
- Greenwood, J., Steinman, L., Zamvil, S.S. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(5):358-70. Epub 2006/04/28.
- Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry*. 2006;97(6):1634-58. Epub 2006/06/30.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92(9):3007-17. Epub 1998/10/27.
- Handa, O., Stephen, J., Cepinskas, G. Role of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in activation and dysfunction of cerebrovascular endothelial cells during early onsets of sepsis. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;295(4):H1712-9. Epub 2008/08/30.
- Hanisch, U.K. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 2002;40(2):140-55. Epub 2002/10/16.
- Hansen, J.D., Vojtech, L.N., Laing, K.J. Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. *Dev Comp Immunol*. 2011;35(9):886-97. Epub 2011/01/19.
- Harris, A.G., Leiderer, R., Peer, F., Messmer, K. Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *The American journal of physiology*. 1996;271(6 Pt 2):H2388-98.

Hildebrand, F., Pape, H.C., Harwood, P., Muller, K., Hoevel, P., Putz, C., Siemann, A., Krettek, C., van Griensven, M. Role of adhesion molecule ICAM in the pathogenesis of polymicrobial sepsis. *Exp Toxicol Pathol.* 2005;56(4-5):281-90. Epub 2005/04/09.

Hirche, T.O., Gaut, J.P., Heinecke, J.W., Belaaouaj, A. Myeloperoxidase plays critical roles in killing *Klebsiella pneumoniae* and inactivating neutrophil elastase: effects on host defense. *J Immunol.* 2005;174(3):1557-65. Epub 2005/01/22.

Hofer, S., Bopp, C., Hoerner, C., Plaschke, K., Faden, R.M., Martin, E., Bardenheuer, H.J., Weigand, M.A. Injury of the blood brain barrier and up-regulation of icam-1 in polymicrobial sepsis. *The Journal of surgical research.* 2008;146(2):276-81. Epub 2008/01/01.

Hopkins, R.O., Jackson, J.C. Long-term neurocognitive function after critical illness. *Chest.* 2006;130(3):869-78. Epub 2006/09/12.

Imamura, Y., Wang, H., Matsumoto, N., Muroya, T., Shimazaki, J., Ogura, H., Shimazu, T. Interleukin-1beta causes long-term potentiation deficiency in a mouse model of septic encephalopathy. *Neuroscience.* 2011;187:63-9. Epub 2011/05/17.

Ishikawa, S., Hayashi, H., Kinoshita, K., Abe, M., Kuroki, H., Tokunaga, R., Tomiyasu, S., Tanaka, H., Sugita, H., Arita, T., Yagi, Y., Watanabe, M., Hirota, M., Baba, H. Statins inhibit tumor progression via an enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)-mediated epigenetic alteration in colorectal cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2013. Epub 2013/12/19.

Iwashyna, T.J., Ely, E.W., Smith, D.M., Langa, K.M. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA.* 2010;304(16):1787-94. Epub 2010/10/28.

Izquierdo, I., Medina, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of learning and memory.* 1997;68(3):285-316. Epub 1997/12/17.

Izquierdo, I., McGaugh, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioural pharmacology.* 2000;11(7-8):517-34. Epub 2001/02/24.

Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A., Medina, J.H. Mechanisms for memory types differ. *Nature.* 1998;393(6686):635-6. Epub 1998/06/26.

Jacob, A., Brorson, J.R., Alexander, J.J. Septic encephalopathy: inflammation in man and mouse. *Neurochemistry international.* 2011;58(4):472-6. Epub 2011/01/12.

Koch, A.E., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., DiPietro, L.A., Elner, V.M., Elner, S.G., Strieter, R.M. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* 1992;258(5089):1798-801. Epub 1992/12/11.

Koch, A.E., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., Johnson, B., Evanoff, H.L., Haines, G.K., Burdick, M.D., Pope, R.M., Strieter, R.M. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation.* 1992;90(3):772-9. Epub 1992/09/01.

- Kohrs, R., Durieux, M.E. Ketamine: teaching an old drug new tricks. *Anesth Analg*. 1998;87(5):1186-93. Epub 1998/11/07.
- Kostandy, B.B. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2012;33(2):223-37. Epub 2011/11/03.
- Kostic, M., Zivkovic, N., Stojanovic, I. Multiple sclerosis and glutamate excitotoxicity. *Reviews in the neurosciences*. 2013;24(1):71-88. Epub 2012/11/16.
- Kouroumichakis, I., Papanas, N., Proikaki, S., Zarogoulidis, P., Maltezos, E. Statins in prevention and treatment of severe sepsis and septic shock. *Eur J Intern Med*. 2011;22(2):125-33. Epub 2011/03/16.
- Kress, J.P. The complex interplay between delirium, sepsis and sedation. *Crit Care*. 2010;14(3):164. Epub 2010/07/01.
- Kreutzberg, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*. 1996;19(8):312-8. Epub 1996/08/01.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:619-42. Epub 1998/04/29.
- Kurata, T., Miyazaki, K., Kozuki, M., Panin, V.L., Morimoto, N., Ohta, Y., Nagai, M., Ikeda, Y., Matsuura, T., Abe, K. Atorvastatin and pitavastatin improve cognitive function and reduce senile plaque and phosphorylated tau in aged APP mice. *Brain Res*. 2011;1371:161-70. Epub 2010/11/30.
- Lanni, C., Lenzken, S.C., Pascale, A., Del Vecchio, I., Racchi, M., Pistoia, F., Govoni, S. Cognition enhancers between treating and doping the mind. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2008;57(3):196-213. Epub 2008/03/21.
- Lapi, D., Marchiafava, P.L., Colantuoni, A. Geometric characteristics of arterial network of rat pial microcirculation. *J Vasc Res*. 2008;45(1):69-77. Epub 2007/09/29.
- Larson, E.B., Kukull, W.A., Katzman, R.L. Cognitive impairment: dementia and Alzheimer's disease. *Annual review of public health*. 1992;13:431-49. Epub 1992/01/01.
- Le Roy, D., Di Padova, F., Adachi, Y., Glauser, M.P., Calandra, T., Heumann, D. Critical role of lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in immune responses against gram-negative bacteria. *J Immunol*. 2001;167(5):2759-65. Epub 2001/08/18.
- Lemstra, A.W., Groen in't Woud, J.C., Hoozemans, J.J., van Haastert, E.S., Rozemuller, A.J., Eikelenboom, P., van Gool, W.A. Microglia activation in sepsis: a case-control study. *Journal of neuroinflammation*. 2007;4:4. Epub 2007/01/17.
- Leonard, E.J., Yoshimura, T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today*. 1990;11(3):97-101. Epub 1990/03/01.
- Lever, A., Mackenzie, I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ*. 2007;335(7625):879-83. Epub 2007/10/27.

Levi, M., van der Poll, T. The role of natural anticoagulants in the pathogenesis and management of systemic activation of coagulation and inflammation in critically ill patients. *Semin Thromb Hemost.* 2008;34(5):459-68. Epub 2008/10/29.

Levi, M., van der Poll, T., Schultz, M. Systemic versus localized coagulation activation contributing to organ failure in critically ill patients. *Semin Immunopathol.* 2012;34(1):167-79. Epub 2011/08/02.

Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.L., Ramsay, G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250-6. Epub 2003/04/12.

Liappis, A.P., Kan, V.L., Rochester, C.G., Simon, G.L. The effect of statins on mortality in patients with bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2001;33(8):1352-7. Epub 2001/09/21.

Lin, H., Xiao, Y., Chen, G., Fu, D., Ye, Y., Liang, L., Fan, J., Yang, X., Sun, L., Xu, H. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin suppresses Toll-like receptor 2 ligand-induced activation of nuclear factor kappa B by preventing RhoA activation in monocytes from rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology international.* 2011;31(11):1451-8. Epub 2010/05/18.

Lu, D., Qu, C., Goussev, A., Jiang, H., Lu, C., Schallert, T., Mahmood, A., Chen, J., Li, Y., Chopp, M. Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2007;24(7):1132-46. Epub 2007/07/06.

Luster, A.D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998;338(7):436-45. Epub 1998/02/12.

Mans, R.A., Chowdhury, N., Cao, D., McMahon, L.L., Li, L. Simvastatin enhances hippocampal long-term potentiation in C57BL/6 mice. *Neuroscience.* 2010;166(2):435-44. Epub 2009/12/31.

Marchant, A., Deviere, J., Byl, B., De Groote, D., Vincent, J.L., Goldman, M. Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet.* 1994;343(8899):707-8. Epub 1994/03/19.

Marchant, A., Bruyns, C., Vandenabeele, P., Abramowicz, D., Gerard, C., Delvaux, A., Ghezzi, P., Velu, T., Goldman, M. The protective role of interleukin-10 in endotoxin shock. *Prog Clin Biol Res.* 1994;388:417-23. Epub 1994/01/01.

Marie, C., Pitton, C., Fitting, C., Cavaillon, J.M. Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGFbeta) of interleukin-8 production by LPS- and/ or TNFalpha-activated human polymorphonuclear cells. *Mediators Inflamm.* 1996;5(5):334-40. Epub 1996/01/01.

Matsukawa, A., Hogaboam, C.M., Lukacs, N.W., Lincoln, P.M., Strieter, R.M., Kunkel, S.L. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J Immunol.* 1999;163(11):6148-54. Epub 1999/11/26.

- McGaugh, J.L. Time-dependent processes in memory storage. *Science*. 1966;153(3742):1351-8. Epub 1966/09/16.
- Medzhitov, R., Janeway, C., Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*. 2000;173:89-97. Epub 2000/03/17.
- Menger, M.D., Steiner, D., Messmer, K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *The American journal of physiology*. 1992;263(6 Pt 2):H1892-900.
- Menger, M.D., Richter, S., Yamauchi, J.I., Vollmar, B. Intravital microscopy for the study of the microcirculation in various disease states. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*. 1999;28(4):542-56. Epub 1999/11/24.
- Miles, A.M., Bohle, D.S., Glassbrenner, P.A., Hansert, B., Wink, D.A., Grisham, M.B. Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(1):40-7. Epub 1996/01/05.
- Miranda, A.S., Vieira, L.B., Lacerda-Queiroz, N., Souza, A.H., Rodrigues, D.H., Vilela, M.C., Gomez, M.V., Machado, F.S., Rachid, M.A., Teixeira, A.L. Increased levels of glutamate in the central nervous system are associated with behavioral symptoms in experimental malaria. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43(12):1173-7. Epub 2010/11/19.
- Moore, K., Roberts, L.J., 2nd. Measurement of lipid peroxidation. *Free radical research*. 1998;28(6):659-71. Epub 1998/09/15.
- Morandi, A., Hughes, C.G., Girard, T.D., McAuley, D.F., Ely, E.W., Pandharipande, P.P. Statins and brain dysfunction: a hypothesis to reduce the burden of cognitive impairment in patients who are critically ill. *Chest*. 2011;140(3):580-5. Epub 2011/09/08.
- Mukaida, N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284(4):L566-77. Epub 2003/03/06.
- Muller, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*. 2003;24(6):327-34. Epub 2003/06/18.
- Murdoch, C., Finn, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000;95(10):3032-43. Epub 2000/05/16.
- Murphy, P.M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:593-633. Epub 1994/01/01.
- Nedergaard, M., Takano, T., Hansen, A.J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature reviews Neuroscience*. 2002;3(9):748-55. Epub 2002/09/05.
- Neumann, H. Control of glial immune function by neurons. *Glia*. 2001;36(2):191-9. Epub 2001/10/12.
- Ni, X.Q., Zhu, J.H., Yao, N.H., Qian, J., Yang, X.J. Statins suppress glucose-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression by regulating RhoA and nuclear factor-kappaB activities in cardiac microvascular endothelial cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013;238(1):37-46. Epub 2013/03/13.

Ninkovic, M.B., Malicevic, Z.M., Jelenkovic, A., Dukic, M.M., Jovanovic, M.D., Stevanovic, I.D. Nitric oxide synthase inhibitors partially inhibit oxidative stress development in the rat brain during sepsis provoked by cecal ligation and puncture. *Gen Physiol Biophys.* 2009;28 Spec No:243-50. Epub 2009/01/01.

Okusawa, S., Gelfand, J.A., Ikejima, T., Connolly, R.J., Dinarello, C.A. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *The Journal of clinical investigation.* 1988;81(4):1162-72. Epub 1988/04/01.

Pahan, K., Sheikh, F.G., Namboodiri, A.M., Singh, I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *The Journal of clinical investigation.* 1997;100(11):2671-9. Epub 1998/02/12.

Papadopoulos, M.C., Davies, D.C., Moss, R.F., Tighe, D., Bennett, E.D. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med.* 2000;28(8):3019-24. Epub 2000/08/31.

Pfister, D., Siegemund, M., Dell-Kuster, S., Smielewski, P., Ruegg, S., Strebel, S.P., Marsch, S.C., Pargger, H., Steiner, L.A. Cerebral perfusion in sepsis-associated delirium. *Crit Care.* 2008;12(3):R63. Epub 2008/05/07.

Pham, C.T. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(7):541-50. Epub 2006/06/27.

Planavila, A., Laguna, J.C., Vazquez-Carrera, M. Atorvastatin improves peroxisome proliferator-activated receptor signaling in cardiac hypertrophy by preventing nuclear factor-kappa B activation. *Biochimica et biophysica acta.* 2005;1687(1-3):76-83. Epub 2005/02/15.

Reis, P.A., Estado, V., da Silva, T.I., d'Avila, J.C., Siqueira, L.D., Assis, E.F., Bozza, P.T., Bozza, F.A., Tibirica, E.V., Zimmerman, G.A., Castro-Faria-Neto, H.C. Statins decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria. *PLoS Pathog.* 2012;8(12):e1003099. Epub 2013/01/10.

Rothwell, N.J. Cytokines and acute neurodegeneration. *Molecular psychiatry.* 1997;2(2):120-1. Epub 1997/03/01.

Russell, J., Cooper, D., Tailor, A., Stokes, K.Y., Granger, D.N. Low venular shear rates promote leukocyte-dependent recruitment of adherent platelets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(1):G123-9. Epub 2002/10/22.

Schulte, W., Bernhagen, J., Bucala, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets-an updated view. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:165974. Epub 2013/07/16.

Seeley, E.J., Matthay, M.A., Wolters, P.J. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;303(5):L355-63. Epub 2012/06/19.

Segal, A.W., Meshulam, T. Production of superoxide by neutrophils: a reappraisal. *FEBS Lett.* 1979;100(1):27-32. Epub 1979/04/01.

Segal, A.W., Dorling, J., Coade, S. Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and morphological studies. The Journal of cell biology.* 1980;85(1):42-59. Epub 1980/04/01.

Semmler, A., Okulla, T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L., Heneka, M.T. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *Journal of chemical neuroanatomy.* 2005;30(2-3):144-57. Epub 2005/08/27.

Semmler, A., Frisch, C., Debeir, T., Ramanathan, M., Okulla, T., Klockgether, T., Heneka, M.T. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Experimental neurology.* 2007;204(2):733-40. Epub 2007/02/20.

Semmler, A., Hermann, S., Mormann, F., Weberpals, M., Paxian, S.A., Okulla, T., Schafers, M., Kummer, M.P., Klockgether, T., Heneka, M.T. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *Journal of neuroinflammation.* 2008;5:38. Epub 2008/09/17.

Shao, B., Oda, M.N., Oram, J.F., Heinecke, J.W. Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol.* 2010;23(3):447-54. Epub 2010/01/02.

Sharshar, T., Carlier, R., Bernard, F., Guidoux, C., Brouland, J.P., Nardi, O., de la Grandmaison, G.L., Aboab, J., Gray, F., Menon, D., Annane, D. Brain lesions in septic shock: a magnetic resonance imaging study. *Intensive Care Med.* 2007;33(5):798-806. Epub 2007/03/23.

Simpson, I.A., Carruthers, A., Vannucci, S.J. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2007;27(11):1766-91. Epub 2007/06/21.

Skirecki, T., Borkowska-Zielinska, U., Zlotorowicz, M., Hoser, G. Sepsis immunopathology: perspectives of monitoring and modulation of the immune disturbances. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012;60(2):123-35. Epub 2012/02/04.

Sonneville, R., Verdonk, F., Rauturier, C., Klein, I.F., Wolff, M., Annane, D., Chretien, F., Sharshar, T. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann Intensive Care.* 2013;3(1):15. Epub 2013/05/31.

Steckert, A.V., Comim, C.M., Mina, F., Mendonca, B.P., Dominguni, D., Ferreira, G.K., Carvalho-Silva, M., Vieira, J.S., Streck, E.L., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F. Late brain alterations in sepsis-survivor rats. *Synapse.* 2013. Epub 2013/06/07.

Steffens, S., Mach, F. Anti-inflammatory properties of statins. *Semin Vasc Med.* 2004;4(4):417-22. Epub 2005/04/30.

Stoll, G., Jander, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Progress in neurobiology.* 1999;58(3):233-47. Epub 1999/05/26.

Streit, W.J., Hurley, S.D., McGraw, T.S., Semple-Rowland, S.L. Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for

interleukin-6 in neuron-glia signaling during regeneration. *Journal of neuroscience research*. 2000;61(1):10-20. Epub 2000/06/22.

Sugaya, K., Chou, S., Xu, S.J., McKinney, M. Indicators of glial activation and brain oxidative stress after intraventricular infusion of endotoxin. *Brain research Molecular brain research*. 1998;58(1-2):1-9. Epub 1998/08/01.

Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D., Tank, D.W. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature*. 1997;385(6612):161-5. Epub 1997/01/09.

Taccone, F.S., Su, F., Pierrakos, C., He, X., James, S., Dewitte, O., Vincent, J.L., De Backer, D. Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study. *Crit Care*. 2010;14(4):R140. Epub 2010/07/30.

Terrando, N., Rei Fidalgo, A., Vizcaychipi, M., Cibelli, M., Ma, D., Monaco, C., Feldmann, M., Maze, M. The impact of IL-1 modulation on the development of lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction. *Crit Care*. 2010;14(3):R88. Epub 2010/05/18.

Thijs, L.G., Hack, C.E. Time course of cytokine levels in sepsis. *Intensive care medicine*. 1995;21 Suppl 2:S258-63. Epub 1995/11/01.

Torres-Duenas, D., Celes, M.R., Freitas, A., Alves-Filho, J.C., Spiller, F., Dal-Secco, D., Dalto, V.F., Rossi, M.A., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q. Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. *British journal of pharmacology*. 2007;152(3):341-52. Epub 2007/07/21.

Tsao, N., Hsu, H.P., Wu, C.M., Liu, C.C., Lei, H.Y. Tumour necrosis factor-alpha causes an increase in blood-brain barrier permeability during sepsis. *Journal of medical microbiology*. 2001;50(9):812-21. Epub 2001/09/11.

Undas, A., Brummel-Ziedins, K.E., Mann, K.G. Statins and blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):287-94. Epub 2004/12/01.

Van Zee, K.J., DeForge, L.E., Fischer, E., Marano, M.A., Kenney, J.S., Remick, D.G., Lowry, S.F., Moldawer, L.L. IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J Immunol*. 1991;146(10):3478-82. Epub 1991/05/15.

Vandijck, D., Decruyenaere, J.M., Blot, S.I. The value of sepsis definitions in daily ICU-practice. *Acta Clin Belg*. 2006;61(5):220-6. Epub 2007/01/24.

Vianna, M.R., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Walz, R., Medina, J.H., Izquierdo, I. Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2000;72(3):353-64. Epub 2000/10/12.

Vincent, J.L., Korkut, H.A. Defining sepsis. *Clin Chest Med*. 2008;29(4):585-90, vii. Epub 2008/10/29.

Violi, F., Calvieri, C., Ferro, D., Pignatelli, P. Statins as antithrombotic drugs. *Circulation*. 2013;127(2):251-7. Epub 2013/01/16.

Voves, C., Wuillemin, W.A., Zeerleder, S. International Society on Thrombosis and Haemostasis score for overt disseminated intravascular coagulation predicts organ

dysfunction and fatality in sepsis patients. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006;17(6):445-51. Epub 2006/08/15.

Wake, H., Moorhouse, A.J., Nabekura, J. Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. *Neuron glia biology*. 2011;7(1):47-53. Epub 2012/05/23.

Walter, D.H., Dimmeler, S., Zeiher, A.M. Effects of statins on endothelium and endothelial progenitor cell recruitment. *Semin Vasc Med*. 2004;4(4):385-93. Epub 2005/04/30.

Wang, Y., Zhang, M.X., Meng, X., Liu, F.Q., Yu, G.S., Zhang, C., Sun, T., Wang, X.P., Li, L., Wang, Y.Y., Ding, S.F., Yang, J.M., Zhang, Y. Atorvastatin suppresses LPS-induced rapid upregulation of Toll-like receptor 4 and its signaling pathway in endothelial cells. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;300(5):H1743-52. Epub 2011/02/15.

Weberpals, M., Hermes, M., Hermann, S., Kummer, M.P., Terwel, D., Semmler, A., Berger, M., Schafers, M., Heneka, M.T. NOS2 gene deficiency protects from sepsis-induced long-term cognitive deficits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(45):14177-84. Epub 2009/11/13.

Weiss, M., Huber-Lang, M., Taenzer, M., Traeger, K., Altherr, J., Kron, M., Hay, B., Schneider, M. Different patient case mix by applying the 2003 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS sepsis definitions instead of the 1992 ACCP/SCCM sepsis definitions in surgical patients: a retrospective observational study. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2009;9:25. Epub 2009/05/20.

Wheeler, M.A., Smith, S.D., Garcia-Cardena, G., Nathan, C.F., Weiss, R.M., Sessa, W.C. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(1):110-6. Epub 1997/01/01.

Wiersinga, W.J., Leopold, S.J., Cranendonk, D.R., van der Poll, T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*. 2013;4(8). Epub 2013/06/19.

Wilson, J.X., Young, G.B. Progress in clinical neurosciences: sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques*. 2003;30(2):98-105. Epub 2003/05/31.

Yamashiro, S., Kamohara, H., Wang, J.M., Yang, D., Gong, W.H., Yoshimura, T. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol*. 2001;69(5):698-704. Epub 2001/05/19.

Yokoo, H., Chiba, S., Tomita, K., Takashina, M., Sagara, H., Yagisita, S., Takano, Y., Hattori, Y. Neurodegenerative evidence in mice brains with cecal ligation and puncture-induced sepsis: preventive effect of the free radical scavenger edaravone. *PLoS One*. 2012;7(12):e51539. Epub 2012/12/14.

Young, G.B., Bolton, C.F., Austin, T.W., Archibald, Y.M., Gonder, J., Wells, G.A. The encephalopathy associated with septic illness. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale*. 1990;13(6):297-304. Epub 1990/12/01.

Zeerleder, S., Hack, C.E., Willemin, W.A. Disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Chest*. 2005;128(4):2864-75. Epub 2005/10/21.

Zhou, H., Andonegui, G., Wong, C.H., Kubes, P. Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation. *J Immunol*. 2009;183(8):5244-50. Epub 2009/09/30.

Zimecki, M., Chodaczek, G., Kocieba, M., Kruzel, M.L. Lethality in LPS-induced endotoxemia in C3H/HeCr mice is associated with prevalence of proinflammatory cytokines: lack of protective action of lactoferrin. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2004;42(2):167-72. Epub 2004/09/15.

Zindler, E., Zipp, F. Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best practice & research Clinical anaesthesiology*. 2010;24(4):551-62. Epub 2011/05/31.

Zinn, C.G., Bevilaqua, L.R., Rossato, J.I., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. On the requirement of nitric oxide signaling in the amygdala for consolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiology of learning and memory*. 2009;91(3):266-72. Epub 2008/10/22.

Zou, C., Qi, H., Liu, Z.H., Han, L., Zhao, C., Yang, X. Simvastatin activates the PPARgamma-dependent pathway to prevent left ventricular hypertrophy associated with inhibition of RhoA signaling. *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital*. 2013;40(2):140-7. Epub 2013/05/17.