

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

O48 Oliveira, Flora Magno de Jesus

Impacto da pneumonia grave no sistema nervoso central: efeitos de curto e longo prazo / Flora Magno de Jesus Oliveira. – Rio de Janeiro, 2016.

xvii, 109 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 86-109

1. Pneumonia. 2. Sepse. 3. Dano cognitivo. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. I. Título.

CDD 616.241

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

***IMPACTO DA PNEUMONIA GRAVE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: EFEITOS  
DE CURTO E LONGO PRAZO***

**FLORA MAGNO DE JESUS OLIVEIRA**

Rio de Janeiro

2016



**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia**  
**Celular e Molecular**

***FLORA MAGNO DE JESUS OLIVEIRA***

**IMPACTO DA PNEUMONIA GRAVE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL:  
EFEITOS DE CURTO E LONGO PRAZO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Dr. Fernando Augusto Bozza

Rio de Janeiro  
2016



**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia**  
**Celular e Molecular**

***FLORA MAGNO DE JESUS OLIVEIRA***

**IMPACTO DA PNEUMONIA GRAVE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL:  
EFEITOS DE CURTO E LONGO PRAZO**

Orientador(es): Dr. Fernando Augusto Bozza

Aprovada em: 28/09/2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup>. Adriana Ribeiro Silva – IOC – FIOCRUZ

Presidente

---

Dr. Felipe Dal Pizzol – Departamento de Medicina - UNESC

Membro

---

Dr. Alysson Roncally Carvalho – IBCCF – UFRJ

Membro

---

Dr<sup>a</sup>. Tatiana Maron Gutierrez – IOC – FIOCRUZ

Revisora

---

Dr. Frederico Ferreira – IOC – FIOCRUZ

Membro suplente

---

Dr. Pedro Leme Silva – IBCCF – UFRJ

Membro suplente

**Rio de Janeiro**

**2016**

*Aos meus pais*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Dr. Fernando Bozza, do qual tenho imensa admiração e gratidão pelos ensinamentos, apoio, confiança e dedicação.

A Dra. Patrícia Bozza e Dr. Hugo Caire pelo apoio e confiança.

Ao Dr. Fabrice Chrétien pela oportunidade de ir à Paris, e por me acolher em seu laboratório.

Ao Dr. Gregory Jouvion e ao Dr. Tarek Sharshar pelos ensinamentos científicos e pela receptividade em Paris.

À Dra Tatiana Maron Gutierrez por aceitar ser revisora deste trabalho, por todo apoio e amizade.

À Dra. Alessandra Saliba e Dra. Christina Plotkowiski, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, da UERJ, pelo fornecimento da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* para a execução dos experimentos.

Ao Dr. Alysson Roncally e Dr. Bruno Bergamini pelas análises de mecânica respiratória.

Às Dras. Danielle Nascimento, Joana D'Ávila, Patrícia Reis, pelas colaborações, tanto teóricas quanto práticas, fundamentais para este trabalho.

À Dra. Camila Valle pela ajuda com as análises de proliferação celular.

À Rachel Novaes e Natália Roque pelo carinho, companheirismo, amizade e ajuda sempre.

À Dra. Mariana Cunha e Sílvio Caetano pela ajuda nos experimentos, pelas conversas e boa companhia.

Ao amigo francês Aurélien Mazeraud que contribuiu muito para minha experiência no Instituto Pasteur e com experimentos deste trabalho.

À André Costa, Camila Batista, Carolina Moraes, Edson Assis, Eugênio Hottz, Giselle Lima, Gláucia Almeida, Isabel Matos, Isaclaudia Gomes, Juliana Lopes, Livia Teixeira e Narayana Fazolini pelos momentos de descontração no laboratório.

À Rose Branco, pelo carinho, conselhos e incentivo sempre e total eficiência e prestatividade.

A todos do laboratório de Imunofarmacologia, com grandes pesquisadores que também me ajudaram durante este trabalho e que contribuem continuamente para meu crescimento científico.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por tudo, sempre.

Ao Moisés, namorado e melhor amigo, pelo incentivo, amor e apoio.

À minha família, por torcerem sempre pelo meu sucesso.

Aos amigos de sempre Anna Clara Bittencourt, Felipe Travassos, Larissa Toledo, Luiza Rezende, Raquel Souza e Thiago Caetano pelos momentos de descontração e boas risadas.

À minha segunda família Maria José, Liana Castro, Demian Castro, Pedro Zille, Maíra Zille e Maria das Graças Zille (In memoriam).

Às amigas biólogas Larissa Quaresma, Aline Brasil, Rosana Pereira, Nívia Maria, Carolina Alves e Suzana Pimentel pelo incentivo.

À Secretaria Acadêmica do IOC, em especial à Julimar Ferreira pela ajuda com todos os trâmites burocráticos durante este período.

A todos do Pavilhão Ozório de Almeida, pelo suporte necessário ao trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ.

Aos meus amigos e todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

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

Marie Curie



## **RESUMO**

A pneumonia é definida como uma inflamação aguda do trato respiratório inferior, e atinge cerca de 450 milhões de pessoas em todo o mundo. A pneumonia pode resultar da infecção por bactéria, vírus e fungos e são classificadas em pneumonias adquiridas na comunidade e pneumonias nosocomiais. Essa doença também pode causar uma complicação pulmonar, chamada de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), que se caracteriza por dano endotelial com aumento da permeabilidade capilar, extravasamento de fluido protéico no espaço alveolar e edema pulmonar. Essa forma grave pode levar a uma inflamação sistêmica com conseqüente falência de múltiplos órgãos e sepse. Doenças infecciosas graves, como a pneumonia, podem acarretar alteração de longo prazo, como o comprometimento do sistema nervoso central (SNC). O conhecimento da fisiopatologia da encefalopatia associada à inflamação sistêmica ainda é bastante limitado e o desenvolvimento de novos modelos experimentais que sejam clinicamente relevantes pode ajudar no esclarecimento dos mecanismos envolvidos na encefalopatia, bem como atuar como ferramenta para o estudo de estratégias terapêuticas capazes de conter ou reverter a possível formação de seqüelas neurocognitivas. Neste estudo tivemos como principal objetivo investigar os mecanismos neuroinflamatórios associados ao declínio cognitivo em um modelo experimental de pneumonia grave. Primeiramente foi necessária a validação de um modelo de pneumonia grave capaz de mimetizar a forma clínica da doença. Camundongos C57BL/6 foram divididos em grupo controle e grupo pneumonia (PA103). Os grupos controle receberam 50 µL de solução salina por instilação intratraqueal e o grupo pneumonia recebeu, pela mesma via e mesmo volume, solução contendo 10<sup>5</sup> CFU da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* 103. Os processos inflamatórios locais e sistêmicos e histopatológicos no pulmão dos animais submetidos ao modelo de pneumonia bacteriana foram analisados. O modelo utilizado levou à uma diminuição da sobrevivência dos animais e aumento do escore clínico dos mesmos. Observamos também que a instilação intratraqueal de PA103 provocou uma intensa migração celular para o parênquima pulmonar, acompanhado de formação de edema pulmonar e aumento de citocinas locais e sistêmicas, bem como uma diminuição da função pulmonar. Além disso, o modelo de pneumonia grave estabelecido no presente trabalho foi capaz de promover alterações importantes no SNC. As alterações agudas compreenderam a ativação de microglia, aumento de mediadores inflamatórios, presença de estresse oxidativo e redução de proteínas sinápticas. As alterações a longo prazo compreenderam uma disfunção cognitiva 13 dias após o insulto pulmonar, tanto no modelo de pneumonia quanto no modelo de ligadura e punção cecal (CLP). No CLP observamos uma recuperação do dano cognitivo, ao contrário do modelo de pneumonia, onde essa alteração se manteve por 30 e 50 dias após o estímulo. Nossas análises também demonstraram persistência da diminuição de proteínas sinápticas observada agudamente. Nosso estudo, portanto, apresenta um modelo de pneumonia grave possivelmente capaz de promover um comprometimento cognitivo permanente. Adicionalmente, as evidências de alterações no SNC no modelo abordado proporciona mais uma ferramenta, clinicamente relevante, para o estudo do comprometimento cerebral observado em neuropatologias, em especial as que envolvem a interação entre resposta inflamatória periférica e SNC.

Palavras-chave: pneumonia, sepse, dano cognitivo, *Pseudomonas aeruginosa*

## **ABSTRACT**

Pneumonia is defined as an acute inflammation of the lower respiratory tract and affects about 450 million people worldwide. Pneumonia can result from infection by bacteria, viruses and fungi and are classified as community-acquired pneumonia and nosocomial pneumonia. This disease can also cause a pulmonary complication, known as acute respiratory distress syndrome (ARDS), characterized by endothelial damage with increased capillary permeability, fluid protein extravasation in the alveolar space and pulmonary edema. This most severe form can that lead to systemic inflammation with subsequent multiple organ failure and sepsis. Severe infectious diseases such as pneumonia, can cause long-term changes, such as CNS (central nervous system) involvement. The pathophysiology of encephalopathy associated with systemic inflammation is still limited and the development of new experimental models that are clinically relevant can help to clarify the mechanisms involved in encephalopathy, and act as a tool for the study of therapeutic strategies to contain or reverse the possible formation of neurocognitive sequelae. The main objective of this study was to investigate the neuroinflammatory mechanisms associated with the cognitive decline in an experimental model of severe pneumonia. First, we validated a severe pneumonia model able to mimic the clinical manifestations of the disease. C57BL/6 mice were divided into control group and pneumonia group (PA103). The control group received 50  $\mu$ L of saline solution by intratracheal instillation and the pneumonia group received 50  $\mu$ L of a solution containing  $10^4$  or  $10^5$  CFU of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* 103, also by intratracheal instillation. The local and systemic inflammatory processes and histopathology in the lungs of the animals submitted to bacterial pneumonia model were analyzed. The model led to a decrease in the survival of animals and increased their clinical score. We also observed that intratracheal instillation of PA103 resulted in an intense cell migration into the lung parenchyma, accompanied by pulmonary edema formation and increased local and systemic cytokines, as well as a decline in lung function. In addition, the severe pneumonia model established in this study was able to induce significant changes in the CNS. The acute changes included microglial activation, increase in inflammatory mediators, the presence of oxidative stress and reduction in synaptic proteins. The long-term changes included cognitive dysfunction 13 days after lung insult, which unlike polymicrobial sepsis model, remained for 30 and 50 days after challenge. Our analysis also showed persistent decrease in synaptic proteins observed in the early time-point. Our study, therefore, presents an experimental pneumonia model possibly capable to induce a permanent cognitive impairment. Moreover, evidence of cognitive decline and long-term synaptic dysfunction presented in the addressed model provides another clinically relevant tool for the study of cerebral impairment seen in neuropathologies, especially those involving the interaction between peripheral inflammatory response and CNS.

Keywords: pneumonia, sepsis, cognitive damage, *Pseudomonas aeruginosa*

## **SUMÁRIO**

AGRADECIMENTOS .....	v
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Pneumonia .....	2
1.1.1 Conceitos .....	2
1.1.2 Epidemiologia e Etiologia .....	3
1.1.2 Aspectos Fisiopatológicos .....	6
1.2. Interação entre o sistema Imune e sistema nervoso central (SNC) .....	10
1.2.1 SNC e o conceito de imunoprivilegiado.....	10
1.2.2 Neuroinflamação .....	12
1.2.3 Inflamação sistêmica e neuroinflamação.....	19
1.2.4 Inflamação sistêmica e efeitos cognitivos de longo prazo .....	20
2.JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS .....	24
3.1 Objetivo Geral .....	24
3.2 Objetivos Específicos .....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
4.1 Animais.....	25
4.2 Grupos experimentais .....	25
4.3 Desenho experimental .....	28
4.3 Preparo da bactéria .....	30
4.4 Modelo experimental de pneumonia .....	30
4.5 Modelo experimental de sepse polimicrobiana .....	30
4.6 Análise do escore clínico .....	31
4.7 Quantificação da celularidade diferencial e total no BAL e sangue.....	32
4.8 Ensaio de atividade mieloperoxidase .....	33
4.9 Quantificação de mediadores solúveis no BAL, plasma e tecido cerebral.....	33
4.10 Avaliação da carga bacteriana no sangue e fígado.....	34
4.11 Avaliação da função pulmonar.....	35
4.12 Análise histológica do pulmão.....	37
4.13 Quantificação de tiol no tecido cerebral .....	37
4.14 Imunohistoquímica .....	38
4.15 Dosagem de proteínas pelo método do ácido bicinconíico ( <i>Bicinconic Acid</i> , BCA, Pierce).....	39
4.16 Coleta de tecido cerebral para ensaios de Western Blot .....	39
4.17 Ensaio Comportamental .....	40
4.17.1 Teste de <i>Freezing</i> .....	40
4.18 Análise Estatística.....	41
5. RESULTADOS .....	42
5.1 Estabelecimento do modelo experimental de pneumonia bacteriana .....	42
5.1.1 Análise da sobrevivência de animais submetidos ao modelo experimental de pneumonia por instilação intratraqueal de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 103 (PA103) .....	42

5.1.2	Análise do escore clínico de animais submetidos ao modelo experimental de pneumonia por instilação intratraqueal de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 103 (PA103) .....	44
5.1.3.1	Análise de parâmetros inflamatórios no pulmão de camundongos C57BL/6 submetidos à instilação intratraqueal de PA103 .....	46
5.1.3.1.1	Análise histopatológica do pulmão de animais C57/BL6 submetidos à instilação intratraqueal de PA103 .....	46
5.1.3.1.2	Avaliação da formação de edema pulmonar em camundongos C57/BL6 instilados com PA103 .....	48
5.1.3.1.3	Análise da celularidade do BAL de camundongos C57BL/6 submetidos à instilação intratraqueal com PA103 .....	49
5.1.3.1.4	Avaliação dos mediadores inflamatórios no BAL de animais submetidos à instilação intratraqueal de PA103 .....	51
5.1.3.1.5	Análise da mecânica pulmonar em animais instilados intratraquealmente com PA103 .....	52
5.1.3.2	Análise da resposta inflamatória sistêmica em camundongos C57BL/6 submetidos à instilação intratraqueal com PA103 .....	53
5.1.3.2.1	Análise da celularidade no sangue de animais submetidos ao modelo experimental de pneumonia grave .....	53
5.1.3.2.2	Avaliação dos mediadores inflamatórios no plasma de animais submetidos à instilação intratraqueal de PA103 .....	55
5.1.3.2.3	Análise da presença de bactérias no sangue e fígado de animais submetidos à instilação intratraqueal de PA103 .....	56
5.2	Caracterização dos efeitos agudos no cérebro de animais submetidos ao modelo de pneumonia grave.....	57
5.2.1	Avaliação da ativação de microglia no cérebro de camundongos C57BL/6 após a instilação com PA103 .....	57
5.2.2	Determinação dos níveis de mediadores inflamatórios presentes no cérebro de animais C57BL/6 após a instilação com PA103.....	60
5.2.3	Avaliação dos níveis de tiol presente no hipocampo de animais C57/BL6 após a instilação com PA103 .....	62
5.2.4	Avaliação da proliferação celular no cérebro de camundongos C57BL/6 após a indução de pneumonia grave .....	63
5.2.5	Avaliação da plasticidade sináptica no cérebro de animais instilados com PA103 após a indução de pneumonia.....	64
5.3	Avaliação das alterações no SNC em animais C57/BL6 submetidos aos modelos de pneumonia grave e CLP 30 dias após os estímulos.....	65
5.3.1	Avaliação dos efeitos sobre a memória aversiva de camundongos C57BL/6 submetidos aos modelos de pneumonia grave e CLP .....	65
5.3.2	Avaliação morfológica da microglia no hipocampo de camundongos submetidos aos modelos de pneumonia grave e CLP.....	67
5.3.3	Avaliação da proliferação celular no cérebro de camundongos C57BL/6 submetidos aos modelos de pneumonia grave e CLP .....	69
5.4	Avaliação de alterações no SNC em camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de pneumonia grave 50 dias após o estímulo .....	72
5.4.1	Avaliação da perda de memória aversiva em camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de pneumonia grave 50 dias após a instilação .....	72
5.4.2	Quantificação de neurônios à longo-prazo no hipocampo de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de PA103 .....	73
5.4.3	Avaliação da disfunção sináptica de longo prazo no cérebro de animais submetidos ao modelo de pneumonia grave .....	74

6. DISCUSSÃO .....	75
7. CONCLUSÕES .....	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Distribuição global de mortes entre crianças até 5 anos, 2010.....	5
Figura 2: Dano tecidual na injúria pulmonar aguda.....	9
Figura 3 - Morfologia da microglia no SNC adulto humano .....	14
Figura 4: Células do SNC com potencial neuroinflamatório .....	19
Figura 5: Grupos experimentais utilizados no presente estudo .....	27
Figura 6 - Representação do desenho experimental utilizado .....	29
Figura 7: Curva de sobrevivência após o desafio com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 103.....	43
Figura 8 - Escore clínico de animais desafiados com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 103..	45
Figura 9 - Análise histopatológica no pulmão de animais C57/BL6 submetidos à instilação intratraqueal de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 103.....	47
Figura 10 - Avaliação da formação de edema pulmonar em animais desafiados com a bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 103. ....	48
Figura 11 - Análise da celularidade de amostras do BAL de camundongos C57BL/6 desafiados com PA103.....	50
Figura 12 - Avaliação dos mediadores inflamatórios no BAL de animais desafiados com PA103.. ..	51
Figura 13 - Análise da função pulmonar em animais desafiados com a bactéria PA103. .....	52
Figura 14 - Análise da celularidade em amostras do sangue de camundongos C57BL/6 desafiados com a bactéria PA103.. ..	54
Figura 15 - Avaliação de mediadores inflamatórios em amostras do plasma de animais desafiados com a bactéria PA103.. ..	55
Figura 16 - Avaliação da presença de bactérias no sangue e no fígado de animais desafiados com a bactéria PA103.. ..	56
Figura 17 - Avaliação da ativação de microglia no cérebro de camundongos C57/BL6 desafiados com a bactéria PA103 .....	58
Figura 18 - Avaliação da ativação de microglia no cérebro de camundongos C57/BL6 desafiados com a bactéria PA103. ....	59
Figura 19 - Determinação dos níveis de mediadores inflamatórios presentes em amostras do tecido cerebral de animais desafiados com a bactéria PA103.. ..	61
Figura 20 – Tiol livre presente em amostras cérebro de animais desafiados com a bactéria PA103.....	62
Figura 21 - Proliferação celular no cérebro de animais desafiados com a bactéria PA103. .....	63
Figura 22 - Expressão de proteínas sinápticas no hipocampo de animais desafiados com a bactéria PA103.....	64
Figura 23 – Função cognitiva de animais desafiados com a bactéria PA103 e de animais submetidos à sepse polimicrobiana.. ..	66
Figura 24 – Morfologia da microglia no cérebro de animais desafiados com a bactéria PA103 e de animais submetidos à sepse polimicrobiana.....	68
Figura 25 - Avaliação da proliferação celular no cérebro de animais submetidos aos modelos de pneumonia grave e CLP .....	71
Figura 26 – Função cognitiva em animais desafiados com a bactéria PA103.....	72
Figura 27 – Quantificação neuronal no hipocampo de animais desafiados com a bactéria PA103.. ..	73
Figura 28 – Expressão de proteínas sinápticas no hipocampo de animais desafiados com a bactéria PA103.. ..	74

## **ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1 - Causa de morte por região .....	4
Tabela 2 - Escore clínico. Parâmetros clínicos utilizados para estabelecer a gravidade do modelo utilizado. ....	32
Tabela 3 - Anticorpos utilizados para a dosagem de citocinas e suas respectivas concentrações.....	34

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

APACHE II – do inglês, *acute physiology and chronic health evaluation*

APC – Células apresentadoras de antígeno (do inglês, *antigen-presenting cells*)

ARDS – Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (do inglês, *Acute Respiratory Distress Syndrome*)

ATS – Sociedade Torácica Americana (do inglês, *American Thoracic Society*)

BCA – Ácido bicinconínico (do inglês, *bicinchoninic acid*)

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*)

BHE – Barreira hematoencefálica

BSA – Albumina bovina sérica (do inglês, *bovine serum albumin*)

CCL – Ligante do receptor de quimiocina CC (do inglês, *cc chemokine ligands*)

CCR – Receptor de quimiocinas da família CC (do inglês, *CC chemokine receptor*)

CECAL – Centro de criação de animais de laboratório

CFU – Unidade Formadora de Colônia (do inglês, *Colony Forming Unit*)

CLP – Ligadura e perfuração cecal (do inglês, *Cecal Ligation and Puncture*)

DALY – Ano de vida ajustado por incapacidade (do inglês, *disability-adjusted life years*)

DAMP – Padrão molecular associado ao dano (do inglês, *damage-associated molecular pattern*)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DO – Densidade ótica

EAE – Encefalomielite autoimune experimental (do inglês, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*)

EAS – Encefalopatia associada à sepse

*E.coli* – *Escherichia coli*

ELISA – Análise de imuno-absorção por ligação enzimática (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*)

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial (do inglês, *endothelial nitric oxide synthase*)

Exo U' - Exotoxina U'

GFAP – Proteína ácida fibrilar glial (do inglês *glial fibrillary acidic protein*)



---

HIC – Países de alta renda (do inglês, <i>high income countries</i> )
IBA-1 – Proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (do inglês, <i>Ionized calcium-binding adapter protein 1</i> )
IFN- $\gamma$ – Interferon-gamma
IL – Interleucina
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida (do inglês, <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
i.p. – Intraperitoneal
KC – Quimiocina derivada de queratinócito (do inglês, <i>keratinocyte-derived chemokine</i> )
LIC – Países de baixa renda (do inglês, <i>low income countries</i> )
LPS – Lipopolissacarídeo
LTP – Potencial de longa-duração (do inglês, <i>long-term potentiation</i> )
M1 – Macrófago do tipo 1
M2 – Macrófago do tipo 2
LB – Luria-Bertani
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1, do inglês <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> )
MRSA – <i>Staphylococcus aureus</i> metilino resistente (do inglês, <i>methicillin resistant Staphylococcus aureus</i> )
NET – Redes extracelulares de neutrófilos (do inglês, <i>neutrophil extracellular traps</i> )
NLR – Receptores semelhantes ao Nod (do inglês, <i>Nod-like receptors</i> )
NO – Óxido nítrico (do inglês, <i>nitric oxide</i> )
OMS – Organização Mundial da Saúde
PA103 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa 103
PAMP – Padrão molecular associado à patógeno (do inglês, <i>pathogen-associated molecular pattern</i> )
PEEP – Pressão positiva ao final da expiração
PBS – Salina tamponada fosfatada (do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i> )
PRR – Receptor de reconhecimento de padrões (do inglês, <i>pattern recognition receptor</i> )
PSI – do inglês, <i>pneumonia severity index</i>
RMS – Via migratória rostral (do inglês, <i>rostral migratory stream</i> )
ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>reactive oxygen species</i> )

---

*S.aureus – Staphylococos aureus*

SDRA – Síndrome do desconforto respiratório agudo

SNC – Sistema nervoso central

SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (do inglês, *systemic inflammatory response syndrome*)

SOFA – do inglês, *sequential organ failure assessment*

T3SS – Sistema de secreção do tipo 3 (do inglês, *Type III Secretion System*)

TCE – Traumatismo crânio encefálico

TLR – Receptores semelhantes ao Toll (do inglês, *Toll like receptors*)

TNF – Fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*)

TSA – Agar de soja triptica (do inglês, *tryptic soy agar*)

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VAP – Pneumonia associada à ventilação mecânica (do inglês, *ventilator-associated pneumonia*)

VCV – Ventilação controlada a volume

## **1. INTRODUÇÃO**

Estudos clínicos têm demonstrado que pacientes que apresentam formas graves de pneumonia com hipoxemia grave apresentam sequelas cognitivas importantes de longo prazo, mesmo após meses ou anos da alta hospitalar (Shah F.A. e cols, 2013; El Solh A. e cols, 2006; Davydow D. S. e cols, 2013).

Apesar de estudos em modelos experimentais de sepse já terem demonstrado a presença de disfunção cognitiva tardia nesses animais, a maioria dos trabalhos avaliaram as causas desse comprometimento cognitivo de forma aguda. Nesse estudo, nós descrevemos, pela primeira vez, um modelo de pneumonia que apresenta um comprometimento cognitivo que parece ser irreversível.

Inicialmente foi necessária a caracterização de um modelo experimental de pneumonia que reproduzisse os parâmetros de resposta inflamatória aguda descritos na clínica. Para isso, foi utilizado o patógeno *Pseudomonas aeruginosa* cepa 103 (PA103). Essa bactéria é capaz de super expressar uma citotoxina, frequentemente presente em casos graves de pneumonia na clínica, chamada de exotoxina U (ExoU). Para isso, foram analisados fatores específicos, locais e sistêmicos, descritos por estarem envolvidos no desenvolvimento da inflamação pulmonar aguda. Subsequentemente à sua caracterização, foi avaliado se esse modelo seria capaz de promover alterações agudas no sistema nervoso central (SNC), através da análise de mediadores inflamatórios, proteínas de sinapse e da morfologia das células do SNC. Uma vez identificadas essas alterações agudas, avaliou-se as consequências dessas modificações à longo prazo, onde pôde-se observar alterações sinápticas, na morfologia das células do SNC e ainda alterações cognitivas nos animais submetidos ao modelo de pneumonia. Uma vez que as alterações cognitivas nesses animais mostraram-se irreversíveis, foi utilizado um modelo de sepse por peritonite polimicrobiana de ligadura e punção cecal (CLP, do inglês *Cecal Ligation and Puncture*) para comparação das alterações morfológicas cerebrais de longo prazo, uma vez que tem sido descrito que o dano cognitivo, bem como disfunções sinápticas no modelo de sepse polimicrobiana é reversível 30 dias após indução da sepse (Moraes C. e cols, 2014).

## **1.1 Pneumonia**

### **1.1.1 Conceitos**

O termo pneumonia atípica foi introduzido pela primeira vez em 1938 pelo Dr. Reimann (Reimann H.A., 1938) e foi relacionado à pneumonias de evolução lenta. Atualmente, a pneumonia é definida, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma inflamação aguda do trato respiratório inferior (WHO, 2006).

Com o avanço das descobertas no campo da microbiologia foram reconhecidos diversos patógenos responsáveis por causar pneumonia.

A pneumonia pode resultar mais frequentemente da infecção por bactérias e vírus, embora fungos e protozoários também possam causar a doença, particularmente em pacientes imunocomprometidos. As pneumonias são classificadas principalmente de acordo com o cenário em que elas ocorreram, classificação reconhecida internacionalmente, sendo assim divididas em pneumonias adquiridas na comunidade (CAP, do inglês *community-acquired pneumonia*) e pneumonias nosocomiais (Torres & Rello, 2009). Entretanto, classificações com base no agente etiológico e na apresentação clínica dos sintomas também podem ser utilizadas.

A CAP é definida como um quadro de sinais, sintomas e alterações radiológicas obtidos fora do ambiente hospitalar e que se desenvolve em até 48 horas após a admissão hospitalar. Pneumonias nosocomiais são definidas pela Sociedade Torácica Americana (ATS, do inglês *American Thoracic Society*) como aquelas que se desenvolvem 48 horas após o internamento.

Recentemente, o conceito de pneumonia associada aos cuidados da saúde (HCAP- do inglês *health-care associated pneumonia*) também vem sendo abordado. Esse conceito foi introduzido em 2005 em um consenso da ATS e Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA, do inglês *Infectious Diseases Society of America*) e estabelece a inclusão dos seguintes subgrupos de pacientes (ATS, 2005):

- Pacientes hospitalizados em caráter de urgência por dois ou mais dias dentre os últimos 90 dias antes da infecção;
- Pacientes que são tratados em sistema de internação domiciliar;
- Pacientes que receberam antimicrobianos por via endovenosa, ou quimioterapia, nos 30 dias precedentes à infecção;
- Pacientes submetidos à hemodiálise.

A pneumonia pode evoluir para formas graves, sendo a causa mais comum de

Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). A “Definição de Berlim” é o conceito mais recente para SDRA e a classifica em leve, moderada e grave (Force e cols, 2012). Adicionalmente, é caracterizada como uma lesão inflamatória pulmonar aguda e difusa que leva ao aumento da permeabilidade vascular e hipoxemia (Force e cols, 2012).

Outra complicação que pode ocorrer em pacientes hospitalizados por pneumonia inclui a sepse. De acordo com o terceiro e mais recente consenso internacional a sepse é classificada em sepse e choque séptico (Singer M. e cols, 2016). A primeira definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada à uma infecção. A segunda como sepse acompanhada por profundas anormalidades circulatórias e celulares capazes de aumentar a mortalidade substancialmente (Singer M. e cols, 2016).

### **1.1.2 Epidemiologia e Etiologia**

Infecções respiratórias inferiores são comuns em todas as partes do mundo e afetam mais de 450 milhões de pessoas por ano. Como consequência desse grande número de casos, estima-se em 4,2 milhões de casos fatais por ano, o que representa 7,1% do total de mortes globais, tornando a pneumonia a terceira causa mais frequente de morte no mundo entre todas as idades. Outros dados importantes dos relatórios da OMS que descrevem as cargas globais de doenças, mostram a pneumonia como a enfermidade com segunda maior taxa de incidência na população e ainda com projeções para permanecer entre as 4 principais causas de morte até 2030 (WHO, 2006; Mathers C.D. e cols, 2006).

No ranking de causas de morte entre os países de alta renda e em desenvolvimento (Tabela 1), as infecções do trato respiratório inferior encontram-se como a primeira causa de morte entre os países de baixa renda (LIC, do inglês *low income countries*) e continuam entre as 4 primeiras causas de morte entre os países de alta renda (HIC, do inglês *high income countries*) (Tabela 1) (WHO, 2004).

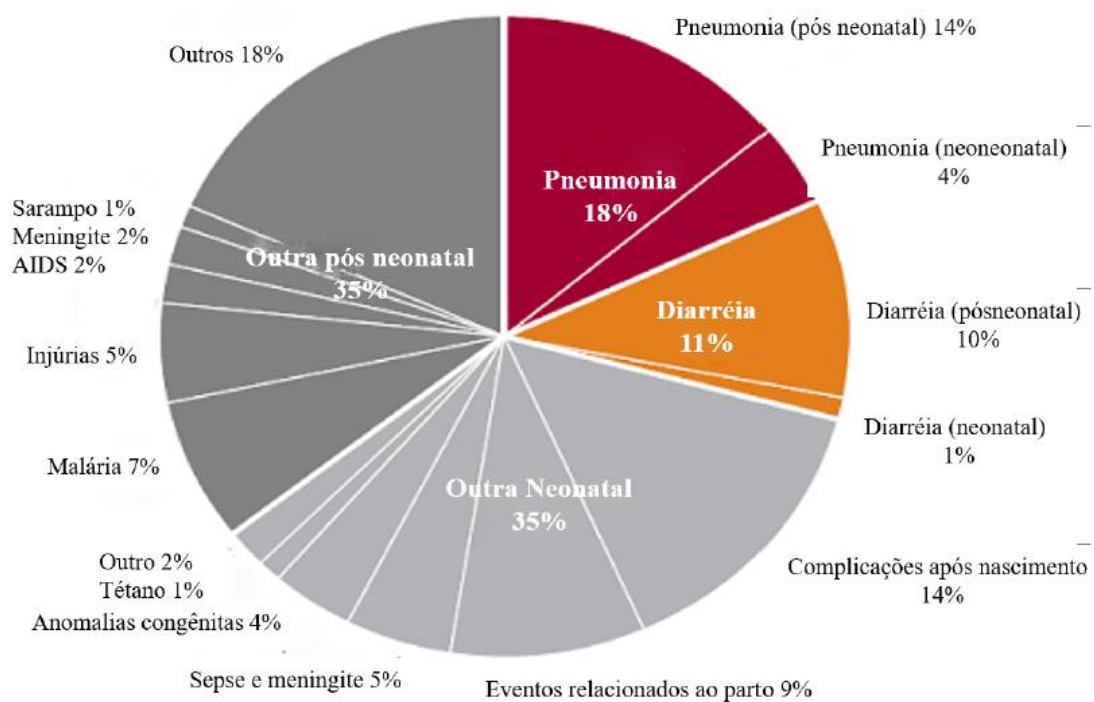
**Tabela 1 - Causa de morte por região, 2004 (adaptado de WHO,2004)**

Doença ou Injúria	Morte (milhões)	% do Total de mortes	Doença ou Injúria	Morte (milhões)	% do Total de mortes
<b>Mundo</b>			<b>Países de Baixa Renda</b>		
1 Cardiopatia isquêmica	7,2	12,2	1 Infecções do trato respiratório inferior	2,9	11,2
2 Doença cerebrovascular	5,7	9,7	2 Cardiopatia isquêmica	2,5	9,4
3 Infecções do trato respiratório inferior	4,2	7,1	3 Doenças diarreicas	1,8	6,9
4 COPD	3,0	5,1	4 HIV/AIDS	1,5	5,7
5 Doenças diarreicas	2,2	3,7	5 Doença cerebrovascular	1,5	5,6
6 HIV/AIDS	2,0	3,5	6 COPD	0,9	3,6
<b>Países em Desenvolvimento</b>			<b>Países de Alta Renda</b>		
1 Doença cerebrovascular	3,5	14,2	1 Cardiopatia isquêmica	1,3	16,3
2 Cardiopatia isquêmica	3,4	13,9	2 Doença cerebrovascular	0,8	9,3
3 COPD	1,8	7,4	3 Câncer de traquéia, pulmão e brônquios	0,5	5,9
4 Infecções do trato respiratório inferior	0,9	3,8	4 Infecções do trato respiratório inferior	0,3	3,8
5 Câncer de traquéia, pulmão e brônquios	0,7	2,9	5 COPD	0,3	3,5
6 Acidentes de trânsito	0,7	2,8	6 Doença de Alzheimer	0,3	3,4

O índice de ano de vida ajustado por incapacidade (DALY, do inglês *disability-adjusted life years*) criado por um programa da OMS para medir o ônus das doenças determina a medida de incapacidade ajustada para os anos de vida considerando os anos vividos com incapacitação (Murray, 1997). Desta maneira, infecções do trato respiratório inferior aparecem como a causa mais importante no mundo em termos de ônus gerados ao indivíduo (WHO, 2004; GBD, 2013).

No Brasil, as infecções do trato respiratório inferior são a terceira principal causa de morte e apresentaram uma taxa bruta de mortalidade em crescimento de 2000 a 2012, de acordo com relatório da OMS em janeiro de 2015 (WHO, 2015).

Crianças, idosos e pacientes imunossuprimidos estão entre as populações de risco (Reynolds et al, 2010). As taxas de mortalidade são especialmente maiores em crianças abaixo de 5 anos (Chopra M. e cols, 2013; Liu L. e cols, 2015) e em adultos acima de 75 anos. Porém, de acordo com dados mais recentes da OMS, de todas as doenças, a pneumonia é a enfermidade que mais mata crianças de 0 a 5 anos no mundo (Figura 1) (WHO, 2012; Walker C.L. e cols, 2013).



**Figura 1: Distribuição global de mortes entre crianças até 5 anos, 2010 (adaptado de WHO, 2012).**

A CAP possui uma incidência que varia de 3 a 40 casos por 1000 habitantes por ano, com taxa de hospitalização entre 40 a 60%. Em torno de 10% dos casos necessitam de internação em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (WHO, 2009). A alta taxa de hospitalização acaba refletindo em um alto custo do tratamento. As bactérias são os microrganismos mais comuns da CAP (Mandell e cols, 2007) entre estas *Streptococcus pneumoniae* é o agente etiológico mais frequente associando-se também a um alto grau de gravidade (WHO, 2004). Outros microrganismos frequentemente encontrados em pacientes com CAP são: *Mycoplasma pneumoniae* relacionado à doença de baixa gravidade, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) causador da pneumonia necrosante (0,064%), Enterobacteriaceae (1,3%) e *Pseudomonas aeruginosa* (0,4%) (Vardakas K.Z. e cols, 2009; Von Baum H., 2010).

Pneumonias nosocomiais são a causa mais comum de infecção em pacientes hospitalizados. Bactérias gram-negativas são os principais agentes encontrados em

pneumonias nosocomiais, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* mais frequentemente isolada em UTIs e também relacionada à pneumonia associada à ventilação mecânica (VAP, do inglês *ventilator-associated pneumonia*) (Berra L. e cols, 2010) que também apresenta alta taxa de mortalidade (Fujitani S. e cols, 2011).

### **1.1.2 Aspectos Fisiopatológicos**

O sistema respiratório representa uma comunicação direta do organismo com o meio externo e está continuamente exposto a uma quantidade abundante de partículas, oferecendo assim um portal de acesso para infecções. O trato respiratório é dividido em trato respiratório superior e inferior, sendo este último acometido nos casos de pneumonia. As vias aéreas inferiores compreendem a parte inferior da traqueia e o parênquima pulmonar, também chamado de setor de troca, do qual fazem parte os pulmões, os brônquios, os bronquíolos e alvéolos.

A troca de gases propriamente dita ocorre nos alvéolos, porção final da árvore respiratória e onde há o contato direto da superfície alveolar com a rede de capilares sanguíneos provenientes da pequena circulação. O revestimento dos sacos alveolares é composto por uma única e fina camada de células epiteliais chamadas de pneumócitos do tipo 1, por onde ocorre a difusão de gases para os capilares sanguíneos, representando assim a barreira alvéolo-capilar. Os pneumócitos do tipo 2 são o segundo tipo celular encontrado nos sacos alveolares e são responsáveis pela produção de surfactante pulmonar que, por sua vez, atua na diminuição da tensão superficial dentro dos alvéolos. Além dos pneumócitos tipo 1 e tipo 2, a parede alveolar inclui os macrófagos alveolares dos quais representam a fração mais expressiva de fagócitos residentes das vias aéreas inferiores (Sibille Y. & Reynolds H.Y., 1990).

Em condições fisiológicas, as diferentes partículas e micro-organismos que penetram as vias aéreas são abordados por um conjunto de defesa que compreende as células do sistema imune bem como a remoção mecânica dessas partículas. Durante a condução do ar para os pulmões, o mesmo passa por importantes sistemas de defesa não-imune que garantem sua umidificação, filtração e aquecimento, impedindo a entrada de partículas estranhas no pulmão. O processo de defesa imune é mais comumente iniciado pela ação de macrófagos alveolares, que irão promover a retirada, sem maiores danos ao tecido, de agentes externos. No entanto, quando determinados agentes virulentos são capazes de resistir à fagocitose, macrófagos alveolares desempenharão o papel de orquestrar a resposta inflamatória e imune.



Agentes patogênicos presentes no espaço alveolar serão reconhecidos por células do sistema imune através de receptores específicos chamados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*). Estes receptores discriminam moléculas exclusivas presentes nas superfícies membranares de patógenos chamadas de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*) se ligando a elas e iniciando assim o processo de resposta imune. Dentre os principais receptores de superfície membranares e citosólicos encontram-se os receptores semelhantes ao toll (TLRs, do inglês *toll-like receptors*) e os receptores semelhantes ao domínio de oligomerização pela ligação de nucleotídeos (NLRs, do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain/nod-like receptors*), respectivamente (Balamayooram T. e cols, 2010).

Em alguns casos, o processo de fagocitose pode estar prejudicado o que levará a um aumento da população microbiana no espaço alveolar. A proliferação de microorganismos virulentos no ambiente extracelular acarretará, em primeira instância, o recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção. Em consequência de sua ativação, os neutrófilos são capazes de migrar da vasculatura para o espaço alveolar e auxiliar de diferentes maneiras: através da liberação de conteúdos com atividade microbicida dos seus grânulos, da fagocitose e destruição do patógeno pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e da formação de redes extracelulares de cromatina, também chamadas de NETs (do inglês *neutrophils extracellular traps*) (Gromes J. e cols, 2011; Brinkmann V. e cols, 2004).

Mediadores inflamatórios possuem papel fundamental na fisiopatologia da pneumonia, SDRA e sepse. Uma vez ativados, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais alveolares podem produzir e liberar citocinas próinflamatórias, amplificando assim a resposta imune. Nesse contexto, citocinas inflamatórias participam ativamente da resposta, como por exemplo a IL-6, que pode apresentar um papel tanto pró quanto anti-inflamatório, influenciando a entrada de neutrófilos no pulmão (Leemans J.C. e cols, 2002). Quimiocinas também participam deste processo, como por exemplo, a quimiocina KC (quimiocina homóloga da IL-8 humana) que tem papel na quimioatração de neutrófilos para o local da inflamação.

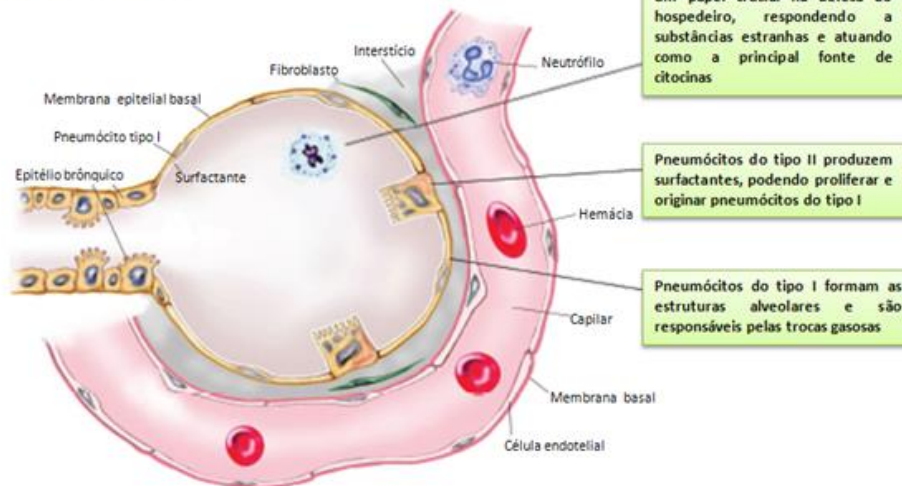
Se por um lado o recrutamento de neutrófilos da circulação para o sítio inflamatório se mostra em um primeiro momento benéfico para o hospedeiro, o estímulo microbiano e/ou sua virulência em altas proporções pode levar a um excesso de neutrófilos no meio, refletindo em uma produção exacerbada de agentes danosos

para o tecido. O dano tecidual, bem como a quebra da barreira alvéolo-capilar resultantes da intensa resposta inflamatória disseminada caracterizam formas mais graves de inflamação pulmonar como por exemplo a SDRA (Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo) (Matthay M.A. e cols, 2011). Como consequência da quebra da barreira alvéolo-capilar, ocorre a passagem de fluido rico em proteínas para o espaço alveolar dando início a formação de edema. A Figura 2 expõe uma síntese dos eventos descritos acima.

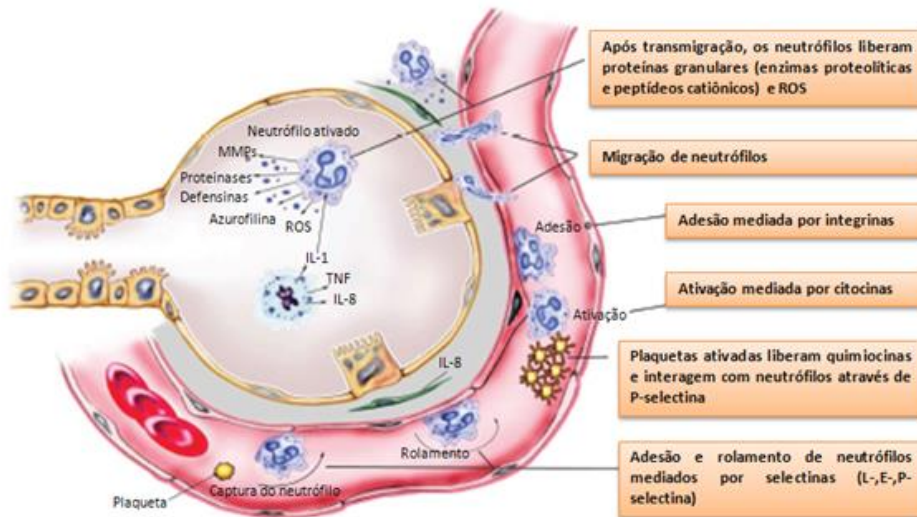
Adicionalmente, do ponto de vista estrutural, a disfunção pulmonar pode ocorrer em consequência dos efeitos do processo inflamatório, e também tem papel importante na fisiopatologia da pneumonia grave (Gattinoni L. e cols, 2004).

Outra consequência do desequilíbrio da resposta inflamatória no pulmão e da descompartimentalização da mesma é a entrada de mediadores da inflamação, do agente microbiano e de seus produtos na circulação sanguínea, o que leva a uma resposta inflamatória sistêmica e sepse.

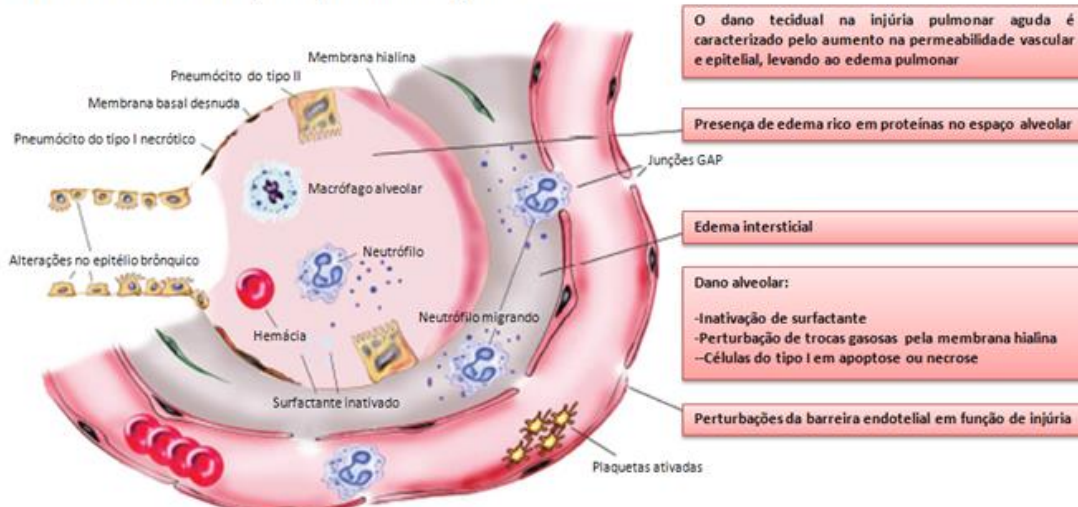
### A. Alvéolo normal



### B. Recrutamento de neutrófilos para o pulmão



### C. Dano tecidual na injúria pulmonar aguda



**Figura 2: Dano tecidual na injúria pulmonar aguda. Adaptado de Grommes e Soehnleint, 2011)** A) Alvéolo em condições fisiológicas com as principais células e suas funções; B) Espaço alveolar após o estímulo infeccioso e C) espaço alveolar após resposta inflamatória exacerbada levando ao dano tecidual e alterações na barreira alvéolo-capilar.

## **1.2. Interação entre o sistema Imune e sistema nervoso central (SNC)**

### **1.2.1 SNC e o conceito de imunoprivilegiado**

Um importante avanço recente na área da neurociência foi uma melhor compreensão das interações entre o sistema imune e o SNC. Durante muito tempo, acreditou-se que o SNC era imunologicamente privilegiado. A condição de privilégio imune é quando determinados órgãos são capazes de tolerar a introdução de um antígeno sem eliciar uma resposta inflamatória. Este termo foi criado em 1948 pelo ganhador do Prêmio Nobel Sir Peter Medawar, quando observou que o cérebro, bem como a câmara ocular anterior, não apresentavam rejeição a aloenxerto, o que não ocorria com o tecido subcutâneo (Medawar, 1948). De fato, outros estudos anteriores ao de Medawar já demonstravam que antígenos encontrados dentro do parênquima cerebral conseguiam escapar ao reconhecimento imunológico (Shirai, 1921; Murphy e cols, 1923), e posteriormente o mesmo acontecimento foi demonstrado com bactérias (Matyszak M.K. & Perry V.H., 1998), vírus (Stevenson P. G. e cols, 1997) e vetores (Byrnes A.P. e cols, 1996).

Privilégio imune foi então considerado uma adaptação evolucionária da qual poupava órgãos tidos como vitais, com capacidade limitada de regeneração, das consequências deletérias da inflamação. Além disso, o privilégio imune garante a manutenção do status quo imunológico dos tecidos fazendo parte da homeostasia dos mesmos. Órgãos que foram descritos imunoprivilegiados incluem: olhos (Niederhorn J.Y. e cols, 2007), SNC (Medawar, 1948), a interface feto/placenta (Guller S. & LaChapelle L., 1999) e testículos (Head J.R. & Billingham R.E., 1985). A presença de barreiras tecido-sanguíneas, relativa ausência de vasos linfáticos e número restrito de células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen-presenting cells*) são algumas das principais características apresentadas por órgãos imunoprivilegiados (Forrester J.V. e cols, 2008).

Embora o SNC tenha sido avaliado durante muitos anos como um ambiente clássico privilegiado imunologicamente, devido à dificuldade de acesso de células do sistema imune ao seu interior, esse conceito tem sido substancialmente revisado ao longo das últimas décadas (Harris M.G. e cols, 2014; Louveau A. e cols, 2015). A observação por Paul Ehrlich de que o SNC não corava após injeção sistêmica de corantes hidrofílicos foi a primeira documentação da existência de uma barreira física

entre essas regiões (Saunders N.R. e cols, 2014), sendo o termo “Bluthirnschranke” (barreira hematoencefálica) utilizado pela primeira vez nos anos 1900 por Lewandowski. A presença da barreira hematoencefálica (BHE) foi considerada um ponto chave na qualificação do SNC como um sítio privilegiado imunologicamente. Particularmente, as células endoteliais que constituem a vasculatura cerebral na BHE estão conectadas umas às outras através de junções complexas do tipo tight, o que dificulta a passagem de macromoléculas forçando-as a uma passagem transcelular e torna a permeabilidade da barreira demasiadamente seletiva. Dentre as outras especialidades da BHE estão a redução da atividade de pinocitose e ausência de fenestrações intercelulares.

Conseqüentemente, estudos foram delineados no sentido de avaliar a participação da BHE na interação entre o sistema imune e o SNC. Wolburg H. e cols, 2005 demonstraram, utilizando tecidos de camundongos com encefalomielite auto-imune experimental (EAE, do inglês *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*), que a migração de leucócitos através da BHE pode ocorrer sem ruptura das junções tight, revelando uma via transcelular pela qual essas células podem adentrar o SNC (Wolburg H. e cols, 2005). Também foi demonstrado que um rompimento mecânico transiente da BHE no trauma parece não ser capaz de provocar um influxo significativo de leucócitos (Dietrich W.T., 1994).

Portanto, em virtude do avanço nessas pesquisas, além de impor fisicamente uma proteção ao cérebro contra metabólitos e toxinas provenientes do sangue, foi estabelecido que a barreira também apresenta um papel importante na limitação e regulação da entrada de células imunes no SNC, e não o de isolar integralmente o mesmo da circulação sistêmica.

Outra característica importante observada que contribuiu para novas definições de imunoprivilegiado é a existência de uma compartimentalização do privilégio imune, uma vez que foram observadas diferenças na imunoreatividade entre as diferentes partes do SNC. Após injeção intracerebral de lipopolissacarídeo (LPS) observou-se uma infiltração de neutrófilos na substância branca, diferentemente da substância cinza onde não houve a entrada dos mesmos (Anderson P.B. e cols, 1992). Também foi visto que o crescimento de um tumor ocorria sem rejeição quando enxertado na região do parênquima cerebral. Em contraste, era possível verificar uma resposta celular com posterior destruição do material quando o mesmo era inserido numa região próxima ao ventrículo (Murphy J.B. & Sturm E., 1923).

O tráfego contínuo de leucócitos, tanto do sistema imune inato quanto do sistema imune adaptativo, para o SNC em condições fisiológicas está bem estabelecido, porém se restringe a determinadas regiões. A vigilância imunológica se dá a partir do sangue através do plexo coróide para dentro do líquido cérebro-espinhal e é feito principalmente por APCs, residentes das meninges e do plexo coróide, e linfócitos T, presentes nos compartimentos relacionados ao líquido cérebro espinhal.

Do ponto de vista imunológico, levando-se em consideração a natureza imunológica das regiões anatômicas, o SNC pode ser organizado em: parênquima, os ventrículos incluindo o plexo coróide e o líquido cérebro-espinhal, e as meninges, cada qual com um tráfego de leucócitos e resposta imune característicos. Portanto, a presença de leucócitos patrulhadores em compartimentos específicos do SNC parece ter uma função fisiológica fundamental, como a de permitir a proximidade entre os leucócitos e o tecido afetado, porém controlando o potencial agressivo dessas células ao SNC.

Essas e outras descobertas contribuíram para uma redefinição do conceito de imunoprivilegiado do SNC, constatando um funcionamento único e diferenciado com relação ao sistema imune periférico, o caracterizando, portanto, como um sítio de especialidade imunológica.

### **1.2.2 Neuroinflamação**

A definição de inflamação refere-se à resposta imune a uma determinada injúria tecidual. Tradicionalmente, a inflamação é caracterizada através de seus sinais cardinais – calor, rubor, edema e dor – descritos por Cornelius Celsus na Roma antiga por volta do ano 30 antes de Cristo. O conceito de perda de função foi introduzido mais adiante, pelo patologista alemão Rudolf Virchow já no século XIX, como o quinto sinal cardinal, estabelecendo também os princípios fisiopatológicos da resposta inflamatória.

Em consequência de sua condição de sítio com especialização imunológica, a resposta inflamatória no SNC vai além do conceito clássico de inflamação que é observado na periferia. Algumas das características principais, responsáveis para que as reações inflamatórias no SNC tenham um comportamento diferenciado das observadas na periferia são: a ausência de células dendríticas no parênquima cerebral, o papel de astrócitos e microglia como células responsáveis pela resposta imune inata no parênquima (Ransohoff R.M. e cols, 2010) e a permeabilidade limitada dos vasos do SNC, o que dificulta a entrada de células da resposta imune adaptativa.

O panorama mecanístico da resposta inflamatória fora do SNC compreende a elevação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, ativação de macrófagos, recrutamento de leucócitos e lesão tecidual. No SNC, também pode-se ser observado durante o processo inflamatório a produção aumentada de mediadores da inflamação (Bellaver B. e cols, 2015), ativação de células da glia, infiltração de células imunes e morte celular acompanhada de quebra da BHE (Bénardais K. e cols, 2014).

Inicialmente, antes do termo “neuroinflamação” entrar em uso, estudos já demonstravam o papel da resposta imune em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (McGeer P.L. e cols, 1987; Griffin W.S.T. e cols, 1989). Ainda não está claro qual ou quais critérios devem ser levados em consideração para designar uma resposta imune no SNC de neuroinflamação, porém diversos estudos consideram uma resposta individual, como por exemplo a produção de citocinas, suficiente para se denominar um processo neuroinflamatório (Vargas D.L. e cols, 2005). As interações neuro-imune podem ocorrer tanto em condições de homeostase quanto patológicas e ambas durante o desenvolvimento e no adulto. De fato, mecanismos imunes são responsáveis pelo remodelamento de circuitos neurais, consolidação de memória, e neurogênese em resposta a estímulos diários do ambiente. No desenvolvimento, uma grande parte dos processos relacionados com a neurogênese é mediado por células imunes residentes (Paolicelli R.C. e cols, 2011). A manutenção da homeostase no adulto também é feita por células do sistema imune circulantes ou residentes no SNC (Cusimano M. e cols, 2012; Hao J. e cols, 2010).

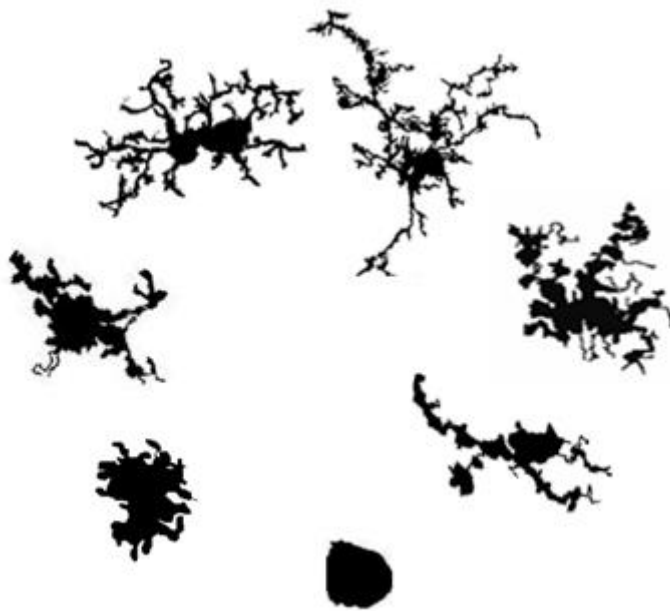
Além dos neurônios, o SNC é composto por outra classe de células residentes não neuronais chamadas de células da glia que compreendem principalmente a microglia, astrócitos e oligodendrócitos. Diferentemente dos neurônios, essas células não participam diretamente da neurotransmissão e interações sinápticas, mas participam da regulação das sinapses e têm função de suporte, defesa e desenvolvimento do SNC.

Uma resposta característica à maioria das injúrias ao SNC é a ativação de microglia e astrócitos no local do dano, sendo essas células participantes ativas da resposta imune com o papel de principais fontes de mediadores inflamatórios e geradores de espécies oxidantes (Sheng W.S. e cols, 2013).

As células da microglia constituem 10% do total de células da glia e são definidas como macrófagos residentes do cérebro, representando, portanto, a primeira linha de defesa do sistema imune no SNC (Lawson, L.J. e cols, 1990). Essas células são originárias da população de células-tronco do saco vitelino e, durante o

desenvolvimento, migram e colonizam o parênquima cerebral antes da formação completa da BHE (Ginhoux F. e cols, 2010). A microglia é classificada morfológicamente em ramificada, amebóide e reativa, sendo esta última encontrada em condições patológicas. A forma amebóide é vista durante o processo de desenvolvimento e após o período pré-natal adquirem o fenótipo ramificado e em repouso. Esse fenótipo em repouso é caracterizado por numerosos e longos processos que permite a cobertura de todo o parênquima, sem sobreposição, no cérebro normal do adulto, morfologia exclusiva da microglia (Nimmerjahn A. e cols, 2005). Uma vez estimuladas, essas células se tornam ativas com retração do número e comprimento de seus processos, aumento do volume do corpo celular e expressão de citocinas e liberação de espécies reativas, agindo também como células fagocíticas (Figura 3) (Kaur C. e cols, 2006; Wierzbza-Brobowicz T. e cols, 2005).

### **Ramificada**



### **Não-ramificada/amebóide/ativada**

#### **Figura 3 - Morfologia da microglia no SNC adulto humano**

Microglias são células morfológicamente e funcionalmente dinâmicas capazes de modificar suas formas de altamente ramificadas a completamente ameboides. A transição pode ser rápida ou a microglia pode permanecer em uma forma por anos (Colton C. A. e cols, 2000). As formas ilustradas representam a transformação que pode ser reversível em cada um dos pontos, com variações dentro de cada forma mostrada. Adaptado de Karperien A. e cols, 2013.



Em condições fisiológicas a microglia age como células sentinelas e estão constantemente rastreando o tecido cerebral para placas, neurônios danificados e agentes infecciosos. Além disso, a microglia pode desempenhar um papel neuroprotetor através da sua habilidade de promover neurogenese e remodelamento sináptico pós-natal, de atuar como células fagocíticas e de reter a inflamação através da liberação de mediadores inflamatórios (Colton, 2009). Em condições patológicas, a microglia irá reconhecer PAMPs ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*) através de seus receptores imunes que incluem TLRs, NLRs e outros receptores scavengers e a partir desse reconhecimento ocorrerá a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 (Interleucina-6), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ , do inglês *tumor necrosis factor- $\alpha$* ) e IL-1 $\beta$  (Interleucina-1 $\beta$ ), além de quimiocinas, como a proteína quimioatraente para monócitos-1 (MCP-1, do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*) e bem como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Este processo de ativação leva a microglia a um fenótipo classicamente ativado, denominado fenótipo M1. Em contraste, a microglia pode apresentar o fenótipo alternativamente ativado, que compreende a liberação de mediadores, como a citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$  que irão inibir a inflamação e restaurar a homeostase do tecido cerebral (Kroner A. e cols, 2014). A TGF- $\beta$  é induzida tanto em lesões cerebrais agudas quanto crônicas e receptores para esta citocina estão presentes nos principais tipos celulares do SNC (Buckwalter M. e cols, 2004; Unsicker K. e cols, 1991). Após uma injúria a sinalização via TGF- $\beta$  pode ser neuroprotetora ou promover fibrose (Buckwalter M. e cols; Moon L.D. e cols, 2001). Esta citocina também está envolvida na formação de sinapse e tem efeitos diretos em neurônios (Tesseur I. e cols, 2006; Sun M. e cols, 2010).

Portanto, a troca do fenótipo de microglia classicamente ativada para o fenótipo de microglia alternativamente ativada, quando ocorrida de maneira correta leva ao reparo eficiente e contenção do dano tecidual, enquanto que a continuidade da liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio pode levar à morte celular e danos no tecido (Kroner A. e cols, 2014).

A função da microglia no SNC é complexa e pode apresentar um papel tanto neuroprotetor como também neurotóxico. Uma das consequências da crença de que o SNC era isolado da circulação, foi a de que a resposta imune quando ocorria no mesmo, era exclusivamente deletéria, com isso muitos trabalhos anteriormente na literatura

focaram em estudar os mecanismos de ativação da microglia em condições patológicas. A natureza dos estímulos pode variar, sendo eles LPS (lipopolissacarídeo), a proteína beta-amilóide, e interferon-gamma (IFN $\gamma$ ), proteína príon (Zhu C. e cols, 2016) e diversos patógenos como o HIV. A microglia também pode ser ativada devido ao trauma, isquemia, infecção ou durante doenças degenerativas.

Os mediadores inflamatórios e espécies reativas, já conhecidos no processo de inflamação que ocorre na periferia, também são produzidos e liberados durante a neuroinflamação e fazem parte do progresso da resposta orquestrada por células do SNC.

As citocinas são pequenas moléculas que promovem a comunicação intercelular entre as células do sistema imune. A ativação dessas células pode levar a liberação de citocinas pró e antiinflamatórias que irão se ligar ao seu receptor correspondente e induzir a transcrição gênica. O perfil de citocinas no SNC é de baixa expressão, onde participam de eventos fisiológicos normais, porém este induz prontamente sua produção uma vez estimulado a partir de uma infecção ou injúria tecidual. Essa produção por células residentes do SNC é essencial para propagar os sinais inflamatórios e determinar o desfecho da resposta. Duas das citocinas importantes no SNC são a IL1- $\beta$  e a IL-6.







A citocina IL1 é uma das mais amplamente estudadas, foi a primeira citocina identificada com ações no SNC e têm a IL-1 $\beta$  como uma das suas formas mais caracterizadas, sendo liberada logo após à injúria ao SNC por microglias ativadas. Possui ações diversas que incluem a indução de fatores de crescimento, redução da liberação de glutamato e indução da produção da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase*). A IL-1 $\beta$  circulante pode ser transportada através da BHE para propagar seus sinais e a IL-1 $\beta$  produzida no parênquima cerebral pode promover o aumento da expressão de moléculas de adesão e levar à infiltração de leucócitos (Ferrari C.C. e cols, 2004). No SNC essa citocina pode ser um marcador confiável de neuroinflamação, uma vez que sua expressão foi demonstrada elevada em diversas doenças do SNC e está relacionada aos processos neuroinflamatórios agudos *in vivo*. Quando exposto à IL-1 $\beta$ , o cérebro de roedores rapidamente leva a ativação de astrócitos e microglia e a injeção em bolus dessa citocina induz o aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias, de quimiocinas quimioatraentes para leucócitos, cicloxigenases e metaloproteínases de matriz (Anderson P.B. e cols, 1992). Além disso, a IL-1 $\beta$ , em humanos, está elevada no cérebro

e no fluido cérebro-espinhal de pacientes que sofreram lesão cerebral ou acidente vascular cerebral. Além da elevação da expressão de IL-1 $\beta$  em lesões agudas, estudos mostram que esta citocina está aumentada também em lesões cerebrais de pacientes com doenças neurodegenerativas como na Doença de Alzheimer e Esclerose Múltipla (Griffin W.S. e cols, 1989; McGuinness M.C., 1997). Além disso, esses achados foram reproduzidos em modelos animais de ambas as doenças (Burm S.M. e cols, 2016).

A citocina IL-6 foi primeiramente demonstrada estar expressa em algumas linhagens de astrocitoma e glioma e com capacidade de induzir diferenciação neuronal (Yasukawa K. e cols, 1987; Satoh T. e cols, 1988). Portanto, tanto células da glia quanto células neuronais expressam IL-6 e seu receptor IL-6R por todo o parênquima cerebral, representando um mediador fundamental no SNC. A IL-6, bem como a IL-1 $\beta$  e outras citocinas, tem sua expressão aumentada na ocorrência de uma infecção ou injúria do SNC. Essa citocina é produzida no SNC durante meningite viral tanto em modelos experimentais de encefalite quanto em pacientes com infecções agudas virais (Frei K. e cols, 1988). Em pacientes que sofreram traumatismo cranioencefálico (TCE), os níveis desta citocina estão mais elevados no SNC do que no plasma. A IL-6 também está relacionada à doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer, onde se observou seu aumento na região das placas amiloides e fluido cérebro-espinhal destes pacientes (Hampel H. e cols, 2005), bem como foi demonstrada a produção da proteína precursora beta-amiloide por esta citocina (Ringheim G.E. e cols, 1998).

De maneira semelhante à observada na resposta imune periférica, no SNC quimiocinas são liberadas por células da glia e promovem neuroinflamação através da atração de leucócitos ao local da injúria (Proost e cols, 1996). A importância das quimiocinas na neuroinflamação se demonstrou inicialmente em estudos com modelo de EAE, na qual a progressão da doença estava associada ao aumento da produção de quimiocinas no tecido cerebral (Ransohoff R.M. e cols, 1993; Glabinski A.R. e cols, 2003). Estudos preliminares *in vitro* demonstraram que a ligação da quimiocina MCP-1 ao seu receptor CCR2 é capaz de induzir a transmigração de forma eficiente de monócitos e macrófagos através do endotélio microvascular cerebral (Stamatovic S.M. e cols, 2005). Além disso, receptores específicos para quimiocinas foram detectados em diferentes tipo celulares no SNC, como microglia, astrócitos, neurônios e microvasculatura cerebral (Ransohoff R.M. e cols, 2007). Citocinas também podem, por sua vez, estar envolvidas na regulação da produção de quimiocinas (Meares G.P. e cols, 2012) e determinadas quimiocinas são também quimioatraentes para microglia.

A ativação de microglia e astrócitos com consequente liberação de citocinas e quimiocinas pode também causar estresse nitrosativo e oxidativo que representa um mecanismo de defesa em baixas concentrações, porém pode levar a um dano neuronal de longo prazo quando ocorre um desbalanço entre sua produção e a capacidade de defesas antioxidantes (Leszek J. e cols, 2016). Essas espécies reativas são consideradas segundos mensageiros, em baixas concentrações, e quando liberadas em altas concentrações podem danificar lipídios e DNA e promover danos ao SNC, levando ao prejuízo de funções celulares e aumento da inflamação (Leszek J. e cols, 2016). O óxido nítrico é um radical livre e tem efeito neurodegenerativo (Wang L. e cols, 2015). A iNOS é principal enzima utilizada por células da glia para a produção de óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) no SNC. O aumento dos níveis de óxido nítrico está relacionado a patologias do SNC como EAE e esclerose múltipla (Smith K.J. e Lassmann H., 2002; Cross A.H. e cols, 1996). O NO ainda pode reagir com oxigênio livre e formar peroxinitrito acarretando a peroxidação lipídica e danificando oligodentrócitos (Cross A.H. e cols, 1997). Na isquemia os neutrófilos são as primeiras células circulantes a aparecerem no local da lesão, uma vez infiltrados começam a produzir ROS e mieloperoxidase (MPO) que irão contribuir para a disfunção da BHE (Justicia e cols, 2003). Estudos também demonstraram o aumento do estresse oxidativo com aumento da idade no cérebro. Um resumo das principais células do SNC e seu potencial neuroinflamatório pode ser encontrado na figura 4.

	Central (residente)	Periférico (origem)	
	<b>Astrócito</b>	<b>Microglia</b>	<b>Monócito</b>
			
Origem	Progenitores neurais	Células mielóides primitivas	Células mielóides
Função	Neuromodulação	Vigilância Imune	Vigilância Imune
Localização	Parênquima SNC	Parênquima SNC	Espaço perivascular Meninges Plexo coróide
Ativação	 Hipertrófica	 Hipertrófica desramificada	 Macrófago Célula Dendrítica
Potencial inflamatório e imune	+IL1- $\beta$ +TNF- $\alpha$ +ROS Glutamato	+++IL1- $\beta$ +++TNF- $\alpha$ +++ROS +fagocitose - Apresentação de antígeno	+++IL1- $\beta$ +++TNF- $\alpha$ +++ROS ++fagocitose ++Apresentação de antígeno

**Figura 4: Células do SNC com potencial neuroinflamatório (adaptado de Wohleb E.S. e cols, 2013).** Classificação das células do SNC quanto sua origem, função, localização, ativação e potencial inflamatório e imune.

### **1.2.3 Inflamação sistêmica e neuroinflamação**

As disfunções do SNC podem ser resultado de insulto direto ou através da inflamação sistêmica. Diversos estudos indicam que os eventos pro-inflamatórios que ocorrem na periferia podem induzir um efeito neurotóxico, como por exemplo pela administração sistêmica de LPS aumentando a degeneração de neurônio motor em modelos animais de esclerose lateral amiotrófica (Nguyen e cols, 2004). Porém, Qin L. e colaboradores demonstraram pela primeira vez o efeito tóxico direto da administração sistêmica de LPS, onde uma única dose intraperitoneal foi capaz de induzir uma inflamação persistente e neurotoxicidade progressiva por até 10 meses no animal adulto (Qin L. e cols, 2007).

A inflamação sistêmica pode ser detectada pelo SNC através dos órgãos circunventriculares, que são determinadas regiões do cérebro onde há ausência da BHE

(Benarroch e cols, 2011), permitindo uma comunicação direta entre o cérebro e o sangue, por rotas neurais, que apresentam receptores de citocinas, como o nervo vago, e pelo transporte ativo de citocinas pela BHE (Duvernoy & Risold, 2007; Quan & Banks, 2007). Portanto, existe uma via bidirecional entre o cérebro e o sistema imune, onde células residentes são ativadas via liberação local ou sistêmica de mediadores da inflamação (Maier S.F., 2003). Esse quadro de inflamação sistêmica com ocorrência de inflamação no SNC pode ser observado na sepse. A sepse está entre as causas mais comuns de admissão em unidades de terapia intensiva, com alta taxa de mortalidade (Angus D.C. e cols, 2001). A sepse é caracterizada por uma disfunção orgânica com perigo a vida causada por uma resposta desregulada à uma infecção (Singer M. e cols, 2016). O SNC é rapidamente afetado durante a sepse, acarretando uma encefalopatia aguda e que está associada ao aumento de mortalidade (Eidelman L.A. e cols, 1996; Sprung C.L. e cols, 1990). A encefalopatia associada à sepse (EAS) é a causa mais comum de encefalopatia nas unidades de terapia intensiva e acredita-se que metade dos pacientes de sepse adquiram essa condição (Young G. B. e cols, 1992; Eidelman L.A. e cols, 1996). Pacientes que apresentam infecção do trato biliar e intestinal, e pneumonia possuem maior risco de desenvolvimento de EAS (Zhang Z., 2015).

A EAS parece estar relacionada a um processo de inflamação cerebral, sem evidência de infecção local, que pode se manifestar como distúrbio de atenção, desorientação, delirium e sonolência, podendo até levar ao coma. (Iacobone E. e cols, 2009). O conhecimento da fisiopatologia da EAS ainda é limitado, porém diversos mecanismos já foram propostos (Flierl M. A. e cols, 2010). A quebra da barreira hematoencefálica pode ser um dos mecanismos centrais que favorecem a neuroinflamação na sepse. Dados mostram que o óxido nítrico derivado da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS, do inglês *endothelial nitric oxide synthase*) contribui para a ativação e disfunção das células endoteliais de vasos cerebrais (Handa O. e cols, 2008). A geração de citocinas locais, alterações de microcirculação e desequilíbrio de neurotransmissores também são importantes eventos que contribuem para o desenvolvimento da EAS (Lucas e cols, 2006).

#### **1.2.4 Inflamação sistêmica e efeitos cognitivos de longo prazo**

A EAS frequentemente é descrita como um processo agudo e reversível, porém alguns estudos mostram que sequelas cognitivas de longo prazo podem ser

consequências da EAS. Um estudo clínico com pacientes idosos com sepse severa mostrou que os sobreviventes apresentavam alterações cognitivas importantes (Iwashyna T. J. e cols, 2010). Adicionalmente, Semmler e colaboradores demonstraram que sobreviventes de sepse apresentavam déficit cognitivo no aprendizado e memória, bem como diminuição do volume do hipocampo (Semmler A. e cols, 2013).

Particularmente, alguns estudos clínicos com pacientes que apresentam inflamação pulmonar grave, têm descrito alterações cognitivas de longo prazo nos sobreviventes. Um estudo interessante sugere uma relação bidirecional entre pneumonia e função cognitiva, onde alterações na cognição ao longo do tempo contribuíram para o aumento de risco para pneumonia, e por outro lado, a internação por pneumonia acelerou as manifestações clínicas de demência (Shah F.A. e cols, 2013). Mais de 70% dos pacientes sobreviventes de SDRA apresentaram comprometimentos cognitivos após alta hospitalar, sendo que 43% deles permaneceram com essas alterações por até um ano (Hopkins R.O. et al 2005). Essas alterações estão relacionadas com a qualidade de vida desses sobreviventes, influenciando em sua capacidade laborativa (Rothenhäusler H.B. e cols, 2001). Os domínios cognitivos mais frequentemente afetados em pacientes, após a hospitalização em UTIs, são a memória e funções executivas (Wilcox M.E. e cols, 2013).

A formação de memória e o aprendizado envolvem regiões específicas do SNC, não sendo necessariamente processadas e armazenadas pela mesma maquinaria neural. Em relação a sua duração, a memória é classificada em memória de curta duração e memória de longa duração. A memória de curta duração é instável e vulnerável a perturbações, durando poucas horas e podendo ou não dar origem à memória de longa duração (Izquierdo I. e cols, 1998; Izquierdo I. e cols, 1999). Na memória de longa duração a informação é adquirida e armazenada por muitas horas, dias ou anos, e pode ser evocada quando necessária (Izquierdo I. e cols, 1998).

Como citado anteriormente, diferentes regiões do cérebro estão envolvidas nos diferentes estágios da formação de memória, dentre elas, destacam-se o hipocampo, a amígdala e o córtex. Particularmente, a região do hipocampo constitui uma estrutura central no processo de formação das memórias, do qual está sujeito à modificações de funções e estruturas de sinapses (Bekinschtein P. e cols, 2010).

As bases moleculares para a formação e consolidação de memória ainda não são completamente compreendidas, porém estudos demonstram o potencial de longa-duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) como o principal, e mais amplamente

aceito, mecanismo de plasticidade sináptica envolvido na codificação da memória no hipocampo. Para que se inicie o LTP é necessária a ligação do neurotransmissor glutamato à um de seus receptores, por exemplo o NMDA (N-metil-D-aspartato), culminando com a indução do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  para o meio intracelular do neurônio pós-sináptico e consequente ativação da transcrição de DNA e síntese proteica (Izquierdo & Medina, 1997).

A ativação crônica de microglia leva à liberação de fatores neurotóxicos, como por exemplo citocinas inflamatórias, por essas células que por sua vez podem acarretar em perda neuronal e indução do dano cognitivo (Kondo S. e cols, 2011; Semmler A. e cols, 2007). Além disso, a resposta inflamatória pode interferir na renovação celular no cérebro afetando a neurogênese no hipocampo (Monje M.L. e cols, 2003).

Diversos mediadores inflamatórios também foram demonstrados interferir na plasticidade sináptica e formação da memória. Em níveis fisiológicos, a citocina  $\text{IL1-}\beta$  é importante para indução e manutenção do LTP no hipocampo, porém quando em concentrações elevadas pode inibir a LTP (Ross F.M. e cols, 2003). Animais geneticamente deficientes para a citocina  $\text{IL-6}$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  e seus receptores do tipo um e do tipo dois ( $\text{TNFR1}$  e  $\text{TNFR2}$ ) apresentavam a consolidação de memória prejudicada (Hryniewicz A. e cols, 2007; Baune B.T. e cols, 2008). Além disso, a citocina  $\text{TNF-}\alpha$  também mostrou estar associada à perda de função cognitiva após alta hospitalar de pacientes com CAP (El Solh A. e cols, 2006).



## **2.JUSTIFICATIVA**

A pneumonia consiste em uma importante causa de morte em todo o mundo e pacientes que apresentam pneumonia grave frequentemente necessitam de cuidados intensivos. Estudos prévios já demonstram, consistentemente, taxas elevadas de mortalidade em um período precoce de 30 dias, porém dados recentes também vêm associando as pneumonias, principalmente as CAP, com mortalidade à longo prazo (Holter J.C. e cols, 2016). Foi demonstrado que a taxa de mortalidade cinco anos após a hospitalização pode ser maior que 50% (Johnstone J. e cols, 2008; Bordon J. e cols 2010). As pneumonias grave, portanto, conferem alto risco de mortalidade à longo prazo.

Outra consequência de longo prazo importante que vem sendo observada em pacientes críticos é a redução substancial da capacidade de retorno às atividades do dia a dia. Grande parte desta diminuição da função laborativa é atribuída ao declínio cognitivo que frequentemente acomete sobreviventes de sepse, e que mais recentemente tem sido observado também em sobreviventes de SDRA, com prevalência de até 78% na alta hospitalar, 46% em um ano e 25% em seis anos (Wilcox M.E. e cols, 2013).

Embora existam diferentes propostas de mecanismos envolvidos na fisiopatologia da disfunção cerebral, a grande parte das análises é feita em um tempo precoce, sendo poucos os estudos que descrevem alterações à longo prazo. O presente estudo, portanto, visa investigar o impacto da pneumonia grave sobre o SNC, descrevendo alterações agudas, mas também observando alterações em um período tardio.

Adicionalmente, é importante ressaltar que o pulmão representa o principal foco inicial de infecção na sepse e que, até o momento, estudos clínicos demonstraram a relação entre pneumonia e dano cognitivo. Portanto é de grande importância o desenvolvimento de novos modelos experimentais que sejam clinicamente relevantes e que possam ajudar no esclarecimento dos mecanismos envolvidos no comprometimento cognitivo tanto na sepse quanto na pneumonia, bem como atuar como ferramenta para o estudo de estratégias terapêuticas capazes de conter ou reverter a possível formação de sequelas neurocognitivas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar as alterações agudas e de longo-prazo no SNC em modelo experimental de pneumonia grave

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Estabelecer um modelo experimental de pneumonia grave em camundongos, através da avaliação da taxa de sobrevivência, escore clínico, parâmetros inflamatórios locais e sistêmicos;
- Caracterizar os efeitos agudos no cérebro de animais com pneumonia experimental grave, através da avaliação de ativação de microglia, presença de estresse oxidativo, quantificação de mediadores inflamatórios, proliferação celular, bem como avaliar a alteração de proteínas sinápticas;
- Investigar as alterações cognitivas de longo-prazo na pneumonia experimental grave e no modelo de sepse polimicrobiana, através da análise comportamental;
- Caracterizar as bases neuro-patológicas do dano cognitivo na pneumonia experimental grave e na sepse polimicrobiana, através da avaliação da ativação da microglia e da proliferação celular.
- Avaliar alterações em proteínas sinápticas e na quantificação neuronal no modelo de pneumonia experimental grave.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Camundongos C57BL/6 com idade de 4 a 6 semanas e pesando entre 18-23g provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fiocruz foram utilizados nos experimentos. Durante a realização dos experimentos os animais foram alocados no biotério do Pavilhão Ozório de Almeida, no qual foram mantidos sob temperatura de 24 °C, com 12 horas de ciclo claro/escuro e com acesso livre à água e à ração. Todos os experimentos estão de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-Fiocruz), segundo licença número LW36/10.

### **4.2 Grupos experimentais**

No presente trabalho dois modelos foram utilizados: o modelo de pneumonia grave e o modelo de sepse polimicrobiana. Os camundongos foram divididos randomicamente em dois grupos para cada modelo experimental (Figura 5), sendo cada grupo constituído de pelo menos 6 animais. Esses animais foram então eutanasiados para análise em diferentes tempos após a indução de pneumonia, por instilação intratraqueal de  $10^4$  ou  $10^5$  unidades formadoras de colônia (CFU, do inglês *colony-forming units*) da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* 103 (PA103) ou de sepse polimicrobiana, pelo modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP). Os seguintes grupos foram utilizados:

- **Modelo de pneumonia – grupo controle:**

Instilação intratraqueal (i.t.) de 50 µL de solução salina estéril apirogênica e tratamento com injeção intraperitoneal (i.p.) de 100 µL de antibiótico Meropenem (30 mg/kg) seis horas após a instilação.

- **Modelo de pneumonia – grupo PA103:**

Instilação intratraqueal (i.t.) de 50 µL de solução contendo  $10^5$  CFU de bactéria *Pseudomonas aeruginosa* 103 e tratamento com injeção intraperitoneal de 100 µL de antibiótico Meropenem (30 mg/kg) seis horas após o estímulo;

- **Modelo de sepse polimicrobiana – grupo Sham operado:**

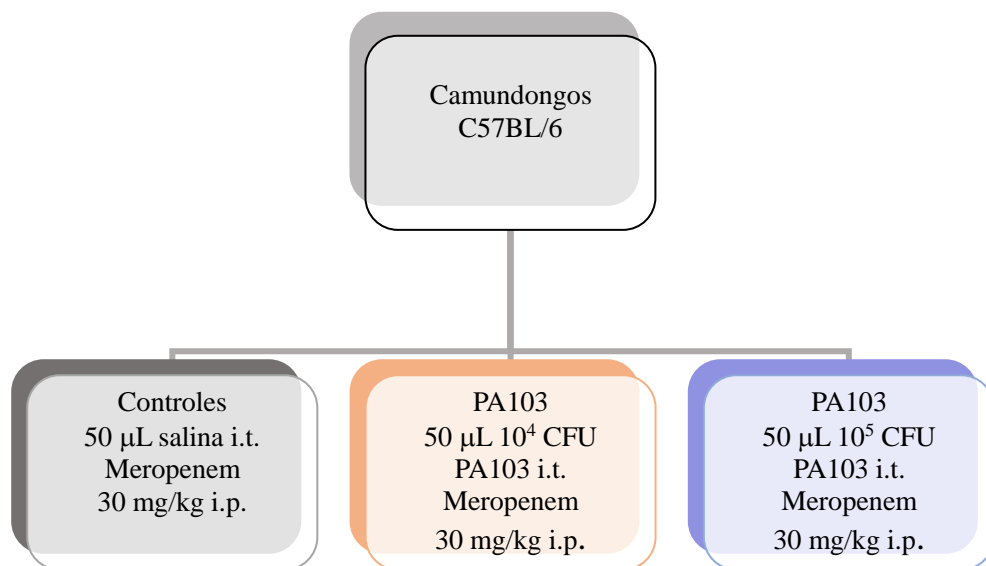
Abertura da cavidade peritoneal, exposição do ceco e retorno do mesmo à cavidade

peritoneal, sem haver ligadura e qualquer extravasamento fecal. Reposição volêmica com injeção subcutânea de 1 ml de salina estéril ao término da cirurgia. Tratamento com injeção intraperitoneal (i.p.) de 100 µL de antibiótico Meropenem (30 mg/kg), 6 horas após a cirurgia.

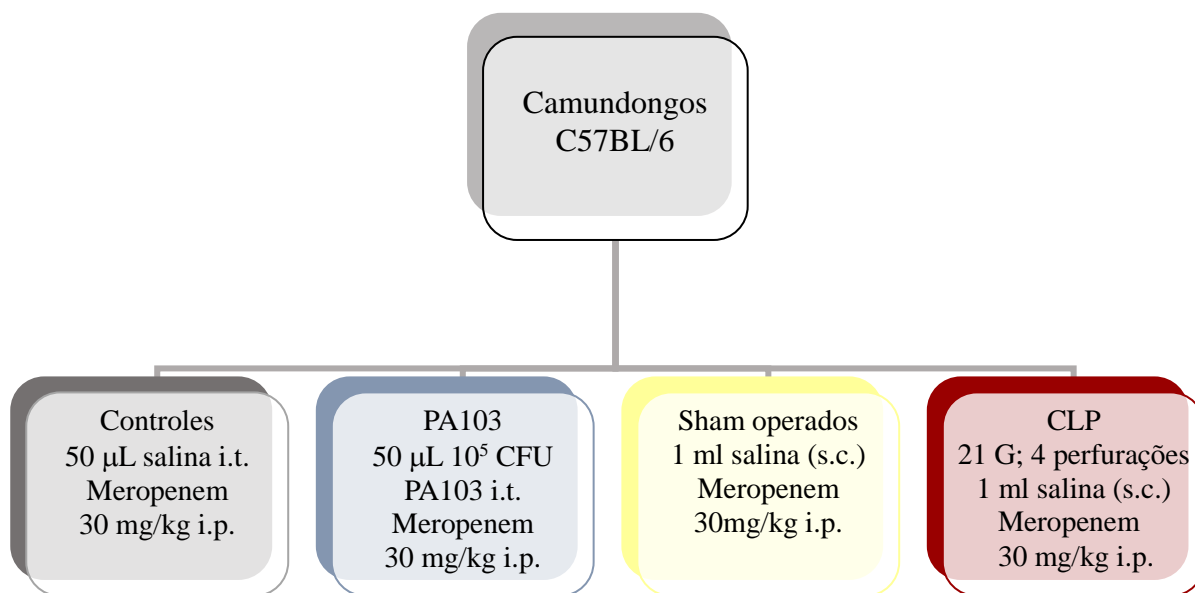
- Modelo de sepse polimicrobiana – grupo CLP:

Abertura da cavidade peritoneal, exposição do ceco, ligadura e perfuração do mesmo com agulha de vinte e um gauge e quatro perfurações com extravasamento fecal para a cavidade peritoneal. Reposição volêmica com injeção subcutânea (s.b.) de 1 ml de salina estéril ao término da cirurgia. Tratamento com injeção intraperitoneal de 200 µL de antibiótico Meropenem (30 mg/kg), seis horas após a cirurgia.

**A**



**B**



**Figura 5: Grupos experimentais utilizados no presente estudo**

Organograma dos grupos experimentais utilizados no presente trabalho, onde (A) representa os grupos utilizados no experimento piloto e (B) representa os grupos utilizados nos experimentos subsequentes. A pneumonia foi induzida através da instilação de 50 µL de 10<sup>5</sup> CFU da bactéria PA103; o modelo de sepse polimicrobiana foi induzido pelo modelo CLP. PA103, *Pseudomonas aeruginosa* 103; CLP, ligadura e perfuração cecal; i.t., intratraqueal; i.p., intraperitoneal; s.b., subcutânea; r.v., reposição volêmica; G, Gauge.

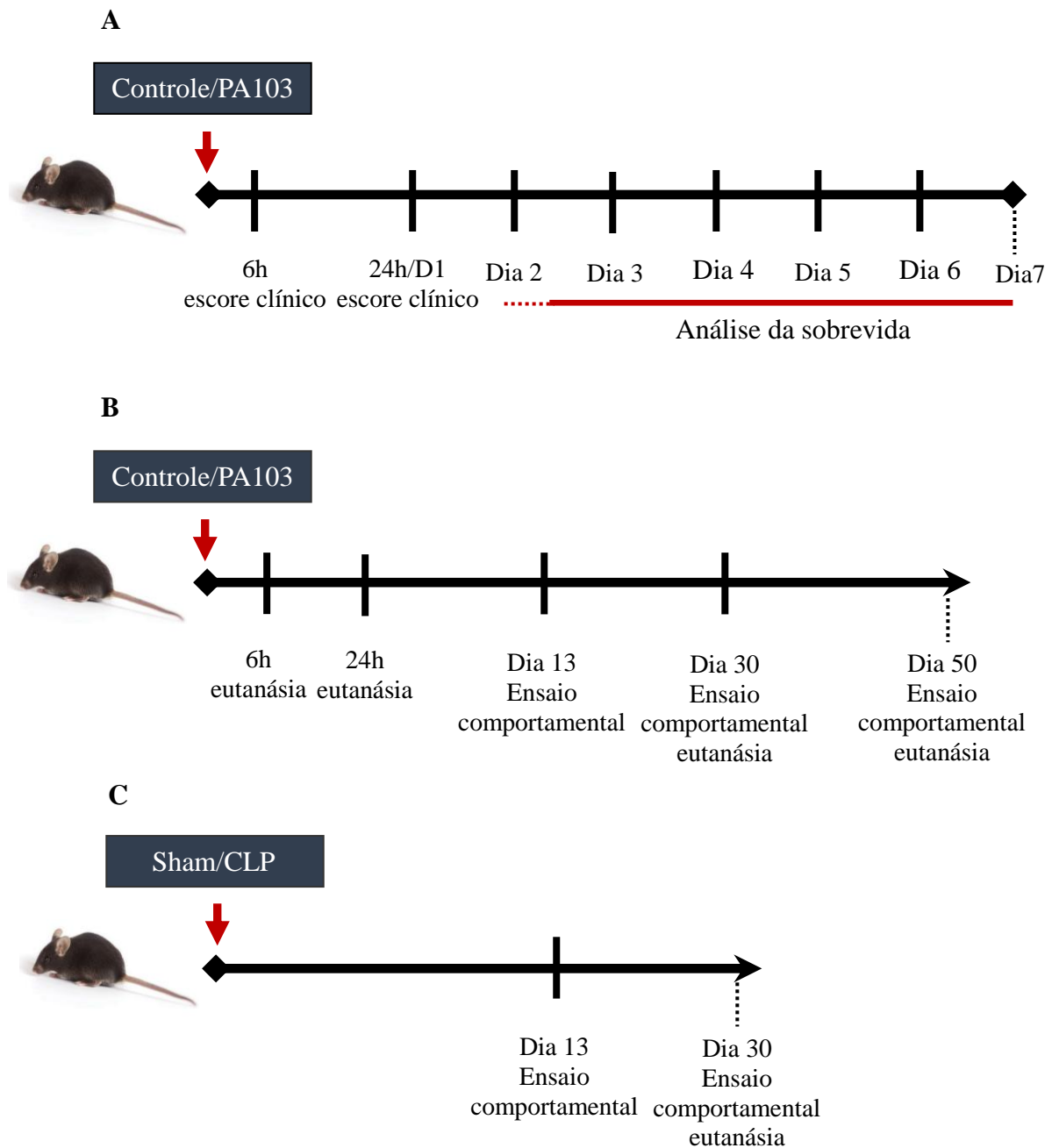
### **4.3 Desenho experimental**

No estabelecimento do modelo de pneumonia grave, os animais C57BL/6 foram submetidos à instilação intratraqueal da bactéria PA103 e foram analisados quanto à sobrevivência, escore clínico, parâmetros inflamatórios locais e sistêmicos.

Para a análise da curva de sobrevivência, os animais C57BL/6 foram submetidos à instilação intratraqueal de  $10^4$  ou  $10^5$  de CFU da bactéria PA103, e a sobrevivência analisada diariamente durante 7 dias. O escore clínico foi analisado nos tempos de 6 horas e 24 horas após a indução de pneumonia.

Animais C57BL/6 submetidos à instilação intratraqueal de  $10^5$  CFU da bactéria PA103 tiveram amostras do tecido pulmonar e do lavado broncoalveolar (BAL, do inglês *bronchoalveolar lavage*) coletadas seis horas após o estímulo, e parâmetros inflamatórios no pulmão foram analisados. Vinte e quatro horas após o estímulo, os animais tiveram amostras do sangue e fígado coletadas, para a avaliação de parâmetros inflamatórios e da presença de bactéria. Amostras do tecido cerebral para a caracterização da presença de neuroinflamação foram coletadas vinte e quatro horas após o estímulo. Outro grupo de animais foi submetido ao ensaio comportamental para avaliação da função cognitiva 13, 30 e 50 dias após a indução de pneumonia. No dia 30 e no dia 50 após o insulto pulmonar os animais foram submetidos ao ensaio comportamental e tiveram amostras do tecido cerebral recuperadas (Figura 6A e 6C).

No modelo de sepse polimicrobiana animais C57BL/6 foram submetidos ao CLP. No dia 13 e no dia 30, esses animais foram submetidos ao ensaio comportamental, e no dia 30 tiveram amostras do tecido cerebral recuperadas (Figura 6B).



**Figura 6 - Representação do desenho experimental utilizado**

Representação esquemática do desenho experimental utilizado para (A) análise da sobrevivida e escore clínico no modelo de pneumonia grave, para (B) modelo de pneumonia grave e para (C) modelo de sepse polimicrobiana. A indução de pneumonia foi realizada através da instilação intratraqueal de 50  $\mu$ l de  $10^4$  ou  $10^5$  CFU da bactéria PA103. A indução de sepse polimicrobiana foi realizada através da ligadura e perfuração cecal (CLP).

### **4.3 Preparo da bactéria**

As cepas da bactéria PA103 foram gentilmente cedidas pelas Dra. Alessandra Saliba e Dra. Christina Plotkowiski do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

Colônias de bactérias crescidas em meio de cultura sólido Ágar Tryptic Soy (TSA) foram selecionadas e colocadas em 3 ml de meio líquido LB (Luria-Bertani broth) overnight. A cultura de bactérias foi centrifugada à 2000 rotações por minuto (RPM – centrífuga LS-3 plus CELM) por 10 minutos e o excesso de sobrenadante foi descartado. A cultura de bactérias foi homogeneizada novamente, diluída em salina estéril nas concentrações de dez, trinta e sessenta vezes em placa de 96 poços e lida em leitor de placas. A leitura de 0,1 densidade ótica (D.O.) representa  $10^8$  bactérias por ml e foi previamente padronizada no laboratório. Após a leitura a bactéria foi diluída na concentração utilizada nos experimentos.

### **4.4 Modelo experimental de pneumonia**

Camundongos C57BL/6 machos foram anestesiados através da inalação de anestésico isoflurano. Após assepsia local com álcool etílico a 70%, foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm na superfície ventral do pescoço do animal. Os lobos da glândula tireóide foram afastados e a traquéia foi exposta. Com a ajuda de uma pinça curva para estabilização do procedimento foi feita a instilação de  $10^4$  ou  $10^5$  CFU da bactéria PA103 ou de salina estéril em um volume final de 50  $\mu$ L. A sutura da pele foi feita com nylon 5-0 (Brasuture) e a recuperação dos animais, após o procedimento, foi acompanhada durante uma hora. Animais instilados com salina estéril foram utilizados como controle negativo. Para os experimentos onde as análises foram feitas 24 horas após o estímulo, tanto os animais do grupo controle quanto os animais do grupo PA103 receberam antibiótico meropenem na dose de 30 mg/kg, em volume de 200  $\mu$ L, por via intraperitoneal (i.p.), 6 horas após o estímulo.

### **4.5 Modelo experimental de sepse polimicrobiana**

Camundongos C57BL/6 machos foram anestesiados através de injeções



intraperitoneais de cloridrato de cetamina (Cloridrato de dextrocetamina – Cristália, 100 mg/kg) e xilazina (Cloridrato de xilazina – Syntec, 10 mg/kg) 5 minutos antes da realização do procedimento. Após tosa e assepsia local com álcool 70%, o ceco dos animais foi externado através de uma incisão de aproximadamente 1 cm na região abdominal. A ligadura cecal com fio de algodão 4-0 foi seguida de quatro perfurações locais com uma agulha de 21G. Uma pequena quantidade de material fecal foi extravasada pelo orifício da punção antes da recolocação do ceco na cavidade abdominal do animal. O abdômen foi suturado em camadas com nylon 3-0 não absorvível. A reposição volêmica foi realizada com 1,0 mL de solução salina estéril por via subcutânea. O antibiótico (Meropenem - dose de 30mg/kg) foi ministrado 6 horas após a cirurgia. Animais sham operados (sem ligadura e punção cecal) foram utilizados como controles e também receberam reposição volêmica por via s.c. de 1,0 mL de solução salina estéril e injeção i.p. de antibiótico Meropenem na dose de 30 mg/kg, 6 horas após a cirurgia.

#### **4.6 Análise do escore clínico**

A análise do escore clínico foi feita de acordo com Machado G.B. e cols, 2009 (Machado G.B. e cols, 2010). Os parâmetros clínicos foram observados em 6 horas e 24 horas após o estímulo. Nesta avaliação, a pontuação mais elevada se correlaciona com o aumento da gravidade dos sintomas clínicos causados pelo estímulo inflamatório. Cada animal foi avaliado com base nos sintomas clínicos descritos na tabela 2, onde o acréscimo de uma pontuação correspondeu à presença e/ou ao nível do parâmetro clínico correspondente. A gravidade foi determinada a partir do somatório dos pontos ao final da análise.

**Tabela 2 - Escore clínico.** Parâmetros clínicos utilizados para estabelecer a gravidade do modelo utilizado.

Parâmetros clínicos	Aspecto	Pontuação
Aparência	pêlo liso	0
	pêlo eriçado	1
Consciência	alerta	0
	sonolento	1
Atividade	alerta	0
	letárgico	1
	moribundo	2
Respiração	normal	0
	forçada	1
Aspecto dos olhos	normal	0
	com secreção	1

#### **4.7 Quantificação da celularidade diferencial e total no BAL e sangue**

A avaliação da contagem de leucócitos foi feita no lavado bronco-alveolar (BAL) e no sangue de animais submetidos ao modelo de pneumonia.

A avaliação da contagem de leucócitos no sangue periférico foi feita pela veia caudal dos animais. Para isso, um pequeno corte na extremidade da cauda do animal foi feito para a retirada de 5  $\mu$ L de sangue para realização da quantificação total de células, e de aproximadamente 10  $\mu$ L para a confecção do esfregaço para a análise diferencial. Para a quantificação dos leucócitos no BAL, os animais foram eutanasiados por inalação de isoflurano procedendo a coleta do mesmo. Essa coleta foi feita expondo-se a traquéia como descrito anteriormente, e um pequeno orifício foi aberto para a introdução de uma cânula acoplada a uma seringa contendo 1 ml de salina tamponada fosfatada 1X (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*). Metade desse volume foi injetado e aspirado por no mínimo 3 vezes para então ser recolhido o volume total de aproximadamente 1 ml de lavado. Para a quantificação de leucócitos totais as amostras de sangue e BAL foram diluídas em líquido de Turk (380x e 20x, respectivamente) e as células foram contadas na câmara de Neubauer (Neubauer Improved) através da visualização ao microscópio óptico (Olympus) nos aumentos de 10x ou 40x. Para a

análise diferencial, 150 µL do BAL foram citocentrifugados (Cytospin 3 - Shandon) a 400 RPM por 5 minutos e coradas, juntamente com os esfregaços sanguíneos, por Panótico rápido, permanecendo imersas por três minutos em cada um dos reagentes. A análise diferencial foi realizada pela observação das lâminas coradas no aumento de 100x.

#### **4.8 Ensaio de atividade mieloperoxidase**

O tecido pulmonar foi pesado e homogeneizado em solução de homogeneização que consistiu em PBS EDTA (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*) 5 µM e brometo de cetildimetil amônio. O homogenato foi centrifugado a 4000 RPM por 15 minutos a 4°C e em seguida o sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 12000 RPM por 15 minutos a 4°C (Centrífuga 5415 R – Eppendorf). Em placas de fundo chato foram adicionados 50 µL de solução de homogeneização + 50 µL de sobrenadante do homogenato + 50 µL de solução de o-dianisidina (0,68 mg/mL). A placa foi então incubada a 37°C na leitora de placas por 15 minutos e em seguida foram adicionados 50 µL de solução de peróxido de hidrogênio (0,006%). Após mais 10 minutos de incubação a 37°C determinou-se a densidade óptica no comprimento de onda de 460 nm.

#### **4.9 Quantificação de mediadores solúveis no BAL, plasma e tecido cerebral**

Para a quantificação dos mediadores solúveis no BAL foi utilizado o sobrenadante proveniente do mesmo, retirado 6 horas e 24 horas após a indução de pneumonia. O BAL foi centrifugado logo após sua coleta pela rotação a 2.000 RPM em centrífuga para microtubos (Eppendorf) e o sobrenadante foi então armazenado a -20°C.

A quantificação de mediadores solúveis foi feita no plasma. Para isso o sangue foi retirado através de punção cardíaca com seringa contendo 50 µL de heparina e centrifugado à 1500 rpm por 5 minutos para obtenção do plasma.

Para a quantificação de mediadores solúveis no cérebro foram preparados homogenatos do tecido após perfusão do animal com solução salina e posterior dissecação do tecido cerebral. As amostras do tecido cerebral foram congeladas com nitrogênio líquido e alocados em freezer -80 °C. Para a preparação dos homogenatos os tecidos foram descongelados e imediatamente homogeneizados em tampão usado para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA, do inglês *radioimmunoprecipitation assay*

*buffer*) contendo coquetel de inibidores de proteases. O homogenato foi centrifugado e seu sobrenadante aliquoteado.

As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e as quimiocinas MCP-1 e CXCL1/KC foram quantificadas por ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) segundo instruções do fabricante. Placas de fundo chato (Nunc) para ensaio em volume reduzido foram cobertas com o anticorpo de captura (50 $\mu$ L/poço) e seladas com filme plástico. Após incubação *overnight* a 4°C, as placas foram lavadas 4x com tampão de lavagem (100 $\mu$ L/poço) e incubadas por 1 hora com a solução de bloqueio (50 $\mu$ L/poço) a temperatura ambiente. A curva padrão foi diluída em tampão de bloqueio+ Tween® 20 e aplicada na placa, bem como as amostras (50 $\mu$ L/poço). Após nova incubação *overnight* a 4°C as placas foram lavadas 6x com tampão de lavagem e o anticorpo de detecção diluído em tampão de bloqueio+ Tween® 20 (50 $\mu$ L/poço) foi adicionado. Uma hora após a incubação com o anticorpo de detecção, as placas foram lavadas 8x com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de streptavidina-peroxidase (50 $\mu$ L/poço). Trinta minutos após a incubação no escuro, foi acrescida a solução de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma Aldrich), substrato para a reação colorimétrica. Após desenvolvimento de cor na curva-padrão, a reação foi parada com solução de parada (50 $\mu$ L/poço) e a placa lida em leitora de placas na absorvância de 405 nm.

**Tabela 3 - Anticorpos utilizados para a dosagem de citocinas e suas respectivas concentrações**

Citocina	Anticorpo de captura	Curva de citocina recombinante	Anticorpo de detecção
<b>IL-6 (R&amp;D, dual set)</b>	2 $\mu$ g/ml	1000 pg/ml - 15,6 pg/ml	0,2 $\mu$ g/ml
<b>TNF-<math>\alpha</math> (R&amp;D, dual set)</b>	1 $\mu$ g/ml	2000 pg/ml - 31,3 pg/ml	0,25 $\mu$ g/ml
<b>CCL2/MCP-1 (R&amp;D, dual set)</b>	0,2 $\mu$ g/ml	500 pg/ml - 7,8 pg/ml	0,05 $\mu$ g/ml
<b>CXCL1/KC (R&amp;D, dual set)</b>	2 $\mu$ g/ml	1000 pg/ml - 15,6pg/ml	0,2 $\mu$ g/ml
<b>TGF-<math>\beta</math> (R&amp;D, dual set)</b>	1 $\mu$ g/ml	2000 pg/ml - 31,3 pg/ml	0,25 $\mu$ g/ml

#### **4.10 Avaliação da carga bacteriana no sangue e fígado**

Após eutanasiados os animais foram levados à cabine de fluxo laminar de maneira a evitar contaminação com qualquer outro patógeno proveniente do ambiente e

todo o procedimento foi realizado no interior da mesma. Para a determinação da carga bacteriana no fígado, os animais foram perfundidos com 20 ml de PBS 1X previamente esterilizado. O fígado foi retirado, pesado e homogeneizado com 5 ml de PBS 1X. Amostras de 20 µL desse homogeneizado foram espalhadas em placas contendo meio de cultura TSA. Essas placas foram alocadas em estufa à 37 °C overnight. Após a incubação, o CFU foi contabilizado e representado de acordo com a fórmula a seguir:  $CFU/mg \text{ de tecido} = (CFU \div \text{volume do homogeneizado plaqueado}) \times \text{fator de diluição} \times (\text{volume total do homogeneizado} \div \text{peso do tecido})$ .

Para a determinação da carga bacteriana no sangue, foi realizada a punção cardíaca para coleta do sangue. Amostras de 20 µL de sangue foram espalhadas em placas contendo meio de cultura TSA. Essas placas foram alocadas em estufa à 37 °C overnight. Após a incubação, o CFU foi contabilizado e representado de acordo com a fórmula a seguir:  $CFU = \text{número de colônias} \times \text{fator de diluição} \times y$ , onde  $y = \text{volume coletado} \div \text{volume plaqueado}$ .

#### **4.11 Avaliação da função pulmonar**

Os animais foram analisados quanto à resistência e à elastância pulmonares 6 horas e 24 horas após o desafio com a bactéria PA103.

Os animais foram sedados com diazepam (1 mg/kg – i.p.) e anestesiados com midazolam (3 mg/kg – i.p.). Após a anestesia, a traqueostomia foi realizada através da introdução jelo 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada à traquéia por meio de fios de algodão. Os animais foram paralisados por meio de injeção intravenosa de 2 mg/kg de brometo de pancurônio (Pavlon® Organon International Incorporation, Nova Jersey, EUA). O animal foi então conectado a um ventilador Flexivent® (SCIREQ, CANADA). A pressão das vias aéreas (Paw) foi medida a partir de uma conexão disposta na entrada do tubo endotraqueal e ligada a um transdutor de pressão (UT PDP-50, SCIREQ, Canada). O fluxo ( $\dot{V}$ ) foi medido por um pneumotacógrafo aquecido (Hamilton Medical, Suíça), posicionado entre a tomada da Paw e o “Y” do circuito de ventilação e conectado a um transdutor diferencial (UT-PDP-50, SCIREQ, Canada). Ambos os sinais foram amplificados e filtrados em 30 Hz por filtros ativos passa-baixas Butterworth de 4ª ordem, com saídas entre  $\pm 5$  Volts.

Todos os sinais da mecânica respiratória foram digitalizados via conversor

analógico-digital (A/D) NI 6009 (*National Instruments*, USA) e armazenados em um computador portátil pelo programa *Data Acquisition System* (DAS) desenvolvido para o propósito operando em *LabVIEW*® versão 8.2 (*National Instruments*, Austin, TX, USA). A frequência de amostragem da placa A/D foi fixada em 1000 Hz por canal. A configuração de entrada da placa foi a *Reference Single Ended* (RSE) com saídas de  $\pm 10$  volts.

Antes de cada experimento foram realizadas as verificações e calibrações das linhas de base dos sinais da mecânica respiratória.

A calibração do transdutor da Paw foi realizada com um circuito composto por uma seringa, coluna de vidro preenchida com água destilada e duas válvulas de três vias conectados, em série, ao canal positivo do transdutor de pressão. Sucessivos valores ascendentes de pressão (-10 e 100 cmH<sub>2</sub>O, em degraus de 2 cmH<sub>2</sub>O) eram obtidos com a pressurização do circuito, e a cada degrau de pressão, o par de valores medido pelo transdutor, em volts, e o observado na coluna de água calibrada, em cmH<sub>2</sub>O eram armazenados. Em seguida, na coleção dos pares obtidos, era obtida uma reta de regressão pelo método dos mínimos quadrados (MMQ), cujo coeficiente angular era o fator de ganho para o sinal de pressão.

A calibração do pneumotacógrafo para sinal de  $\dot{V}$  foi realizada imediatamente antes de cada experimento com o animal ventilado em ventilação controlada a volume (VCV) com um volume corrente ( $V_T$ ) de 8-10 mL/kg, frequência respiratória (FR) de 80 respirações/min, relação inspiração:expiração (I:E) de 1:1 e pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH<sub>2</sub>O. O sinal de  $\dot{V}$  era gravado por um minuto seguido por uma pausa de 10 segundos. Logo após, o arquivo gerado era processado no aplicativo "calibra fluxo" (LEP/UFRJ, Brasil) com um algoritmo escrito em *MATLAB 2006* (*MathWorks Inc.*, Natick, EUA) que determinava, pelo MMQ, os coeficientes de uma regressão de segunda ordem que melhor se ajustavam aos valores medidos. Estes coeficientes eram utilizados como ganho para o sinal de  $\dot{V}$ .

Os sinais da Paw e a  $\dot{V}$ , salvos pelo DAS, foram importados e processados pelo aplicativo MECANICA operado em *MATLAB 2006* (*MathWorks Inc.*, Natick, EUA). Antes do processamento, os sinais da mecânica respiratória passaram por uma inspeção visual para que fossem identificados prováveis artefatos, ruídos ou qualquer evidência de um esforço muscular respiratório. Além disso, no sinal de  $\dot{V}$ , também foram observados possíveis desalinhamentos do *off-set*. O critério adotado para a identificação

do desnivelamento da linha de base foi a presença de um *off-set* diferente de zero no gráfico  $\dot{V}$  em função do tempo, durante uma pausa expiratória de 10 segundos. Caso o desnivelamento fosse confirmado, um valor era adicionado ao *off-set* afim de deslocá-lo para zero. Posteriormente, os ciclos respiratórios foram detectados a partir do sinal da  $\dot{V}$ , sendo os trechos inspiratório e expiratório identificados a partir de um limiar mínimo volume ( $0,5.V_T$ ). O volume era calculado como a integral da  $\dot{V}$  em cada trecho. Para cada ciclo respiratório, um índice de correção do volume era aplicado à expiração de modo a garantir que o volume expiratório fosse igual ao inspiratório. Em seguida, o volume expiratório final tinha seu valor ajustado para zero. Em um segundo momento, os sinais de Paw,  $\dot{V}$  e volume foram utilizados para as estimativas dos parâmetros de mecânica ventilatória com o MMQ, considerando o modelo unicompartimental homogêneo. A resistência e elastância pulmonares foram analisadas no baseline inicial, onde não houve interferência do ventilador.

#### **4.12 Análise histológica do pulmão**

Os animais foram eutanasiados 6 horas após a indução de pneumonia e o pulmão coletado para análise histológica. Após a eutanásia os animais foram perfundidos e o pulmão esquerdo foi coletado e alocado em falcon contendo 12 ml de solução fixadora de formalina com tampão neutro Millonig a 10%. O material foi desidratado através da imersão em soluções com concentrações crescentes de etanol, sendo estas 70%, 80%, 90% e 100%, com duração de 1 hora para cada concentração. Após a fixação o material foi embebido em parafina, obtendo-se posteriormente cortes histológicos com 4  $\mu$ M de espessura. As lâminas contendo os cortes foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas por microscopia óptica (Microscópio Olympys BX41Mellville, NY, USA) no aumento de 200X.

#### **4.13 Quantificação de tiol no tecido cerebral**

A preparação das amostras de tecido cerebral para quantificação de tiol é realizada de acordo com o mesmo protocolo utilizado para a dosagem de mediadores solúveis previamente descrito (seção 4.9). Após o preparo do tecido, as amostras foram diluídas na concentração 1:1 em solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e centrifugadas a 3000 rpm por 14 minutos a 4 C. Em seguida, adicionou-se 300  $\mu$ L de

solução Tris-HCL (0,4M) contendo 30 mM de EDTA (pH 8.9) e DNTB 1,7 mM (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) a 75 µL de sobrenadante.

Após 30 minutos, a solução foi lida em leitor de placa a 412 nm. O resultado foi normalizado pela quantificação de proteínas.

#### **4.14 Imunohistoquímica**

Os animais foram eutanasiados com isoflurano e perfundidos com 20 ml de solução salina. Após a perfusão o cérebro foi retirado e os hemisférios foram separados. Para a realização das imunohistoquímicas, um hemisfério foi fixado em solução de 4% paraformaldeído (PFA) por no máximo 3 dias. Foram utilizados diferentes protocolos de imunohistoquímica. Para microscopia confocal, após a fixação com 4% PFA, o tecido foi incubado com solução de sacarose 20% para crioproteção por 3 dias, congelado em gelo seco pulverizado e armazenado em -80°C. Cortes histológicos de 40 µm foram obtidos em criostato, incubados com solução de bloqueio PBS 1X contendo 0,3% Triton e 3% BSA por 2 horas, lavados duas vezes com PBS 1X e incubados com IgG de coelho anti – Ionized calcium binding protein1 (diluição 1:400, marca Wako) overnight. Após 3 lavagens com PBS 1X as fatias foram incubadas por 2 horas com anticorpo secundário conjugado com Alexa 488, lavadas mais duas vezes com PBS 1X e montadas com meio de montagem Vectashield com DAPI. Fotomicrografias das células Iba-1 positivas do hipocampo e de RMS foram obtidas em microscópio confocal (Leica TCS – SPSAOPS) com objetiva de 63x. A quantificação da ativação microglial foi feita através de contagem do número de células Iba-1 positivas com morfologia ativada (corpo celular aumentado e diminuição do número de ramificações) em relação ao número total de células Iba-1 positivas por campo, e expressa como porcentagem de microglia ativada. Pelo menos 3 fatias por animal foram fotografadas e analisadas.

Para as análises automatizadas de Iba-1, após a fixação em 4% PFA a solução foi trocada por 0,01% PFA e cortes histológicos de 80 µm foram obtidos em vibrátomo. Todo o hemisfério foi seccionado na orientação coronal. Os cortes obtidos em vibrátomos foram incubados com solução de bloqueio PBS 1X contendo Triton 10% e 5% de BSA por duas horas. Na próxima etapa as seções foram incubadas overnight com os anticorpos primários em solução de bloqueio (IgG de coelho anti – Ionized calcium binding protein1, diluição 1:200, Wako), ou Ki67 (IgG de coelho anti Ki67 1:200 - Abcam) ou NeuN (IgG de camundongo 1:100 - Abcam). Após 3 lavagens com PBS 1X



as fatias foram incubadas por 4 horas com anticorpo secundário conjugado com Alexa 546. O núcleo foi marcado com Hoercht na diluição de 1:4000. Após a retirada do anticorpo secundário as fatias foram lavadas 3 vezes com PBS 1X por 5 minutos e montadas em lâminas com meio Aquamount. Os controles consistiram em fatias incubadas somente com anticorpo secundário para ausência de marcação. As análises automatizadas foram feitas com microscópio confocal Cell Voyager 1000 (CV1000 – Iokogawa Global) com objetiva de 60X. As análises foram feitas na região do hipocampo através do software Image J. As análises de morfologia da microglia foram feitas através de software de análise tridimensional sholl realizada no Laboratório de Histopatologia Humana e Modelos Animais, Instituto Pasteur, Paris, França.

#### **4.15 Dosagem de proteínas pelo método do ácido bicinonínico (*Bicinchoninic Acid*, BCA, Pierce)**

O Reagente de trabalho foi preparado juntando-se 50 partes de Reagente BCA A e uma parte de Reagente BCA B. Uma curva padrão (de 0,01562 a 2mg/mL) foi construída através de diluições seriadas a partir da albumina de soro bovino (BSA) fornecida pelo fabricante. Dez microlitros das amostras de sobrenadante de BAL ou de homogenato de tecido pulmonar em tampão de lise para Western Blot (100x diluído em PBS) foram adicionadas aos poços contendo 70  $\mu$ L de Reagente de trabalho. A placa de fundo em U (Nunc) foi incubada na estufa (Labline) a 37°C por 30 minutos e a leitura das amostras foi realizada a 562 nm na leitora de placas.

#### **4.16 Coleta de tecido cerebral para ensaios de Western Blot**

Animais desafiados com PA103 foram eutanasiados 24 horas, 30 e 50 dias após a indução de pneumonia. Após perfusão dos animais com solução salina, o cérebro foi coletado e o hipocampo foi isolado. As amostras de tecido para Western Blot foram maceradas com 100  $\mu$ L de tampão RIPA acrescido de coquetel de inibidores de protease, em seguida as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos (Centrífuga Allegra® X-15R – Blackman Coulter). O sobrenadante foi coletado e foi realizada a dosagem de proteínas utilizando o kit BCA (seção 4.15). Após a quantificação de proteínas o sobrenadante foi congelado a -20 °C até o momento de realização da técnica. Uma vez descongelado, parte do sobrenadante foi acrescido de

tampão de amostra na proporção necessária para a obtenção de 80 µg de proteína. Essa solução foi então aquecida a 100 °C por 5 minutos e aplicada nos poços do sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida. O padrão de peso molecular Rainbow também foi aplicado em um poço separado. Após a corrida no gel, a transferência das proteínas foi feita para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *polyvinylidene fluoride*) fluor previamente ativada com metanol absoluto. Ao término da transferência a membrana foi incubada com 10 ml de tampão de bloqueio (PBS 1X + 5% de soro de albumina bovina + 0,05% de Tween) por uma hora em agitação. Em seguida, a membrana foi incubada em agitação com anticorpos específicos anti-PSD95 (diluição 1:400 - Abcam – AB18258) e anti-sinaptofisina (diluição 1:400 - Abcam – AB8049) diluídos em solução de bloqueio por até 24 horas. As membranas foram então lavadas três vezes com PBS 1X acrescido de 0,05% de tween, sendo cada lavagem realizada por 5 minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com IRDye 680 Rd (Li-cor 926-68170) ou IRDye 800 cw (Li-cor 824-08365). O equipamento Odyssey foi utilizado para escaneamento das membranas e o software ImageStudio™ (Li-cor) para análise da densidade das bandas.

#### **4.17 Ensaio Comportamental**

##### **4.17.1 Teste de Freezing**

O teste freezing é constituído de um dia treino e uma dia teste. No dia treino o animal foi colocado em uma caixa cuja superfície é feita de grades das quais será transmitida uma corrente elétrica. O aparelho indutor de corrente elétrica é conectado à caixa e foi atribuído um valor de corrente de 0,6 mA com duração de 3 segundos. Após 30 segundos na caixa o animal recebeu a primeira corrente elétrica que teve a duração de 3 segundos. Após 30 segundos o animal recebeu uma segunda corrente elétrica que também teve a duração de 3 segundos. 30 segundos após a segunda corrente elétrica o animal é retirado da caixa. No dia teste o animal foi colocado novamente na caixa com as grades permanecendo em observação por 180 segundos, na ausência de corrente elétrica. Durante os 180 segundos foi contabilizado o tempo em que o animal permanece estático na caixa.

#### **4.18 Análise Estatística**

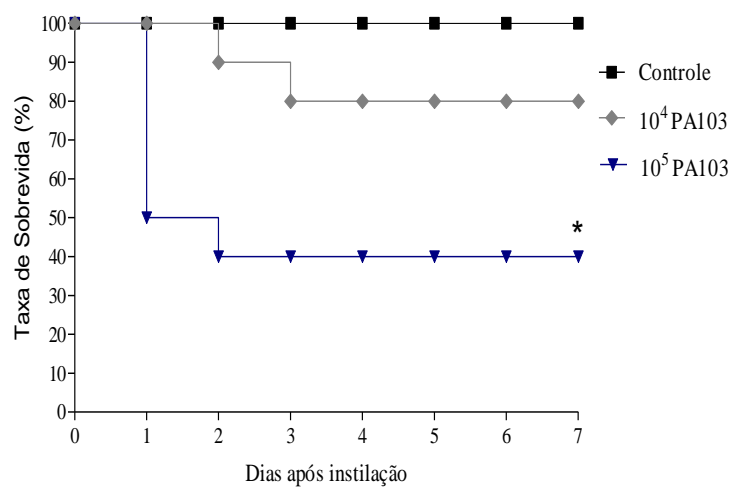
Os dados foram analisados com o software Graphpad Prism versão 5.0. A análise da normalidade foi feita através do teste Kolmogorov-Smirnov. O teste Mann-Whitney foi utilizado para os dados não paramétricos e os dados normais foram feitos através do teste *T* de Student. Para a análise estatística da curva de sobrevida foi utilizado o teste Mantel-Cox logrank. Os dados quantitativos são mostrados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e o nível de significância foi estabelecido como  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Estabelecimento do modelo experimental de pneumonia bacteriana**

#### **5.1.1 Análise da sobrevida de animais submetidos ao modelo experimental de pneumonia por instilação intratraqueal de *Pseudomonas aeruginosa* 103 (PA103)**

Avaliamos a mortalidade de animais submetidos à instilação intratraqueal da bactéria PA103 com duas doses de bactéria distintas escolhendo como base estudos do grupo do laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) (Machado G.B. e cols, 2011; Da Cunha L.G. e cols, 2015). Para isso, camundongos C57BL/6 foram submetidos à instilação intratraqueal de  $10^4$  ou  $10^5$  CFU de PA103. Animais do grupo controle foram instilados com 50  $\mu$ L de salina estéril. O antibiótico Meropenem foi administrado 6 horas após a cirurgia (30 mg/kg – i.p.) nos animais de ambos os grupos. A mortalidade dos animais foi observada diariamente no período total de sete dias. Como observado na figura 7, o grupo cujo inóculo foi de  $10^5$  CFU apresentou uma sobrevida de 40% ao final dos sete dias, enquanto que o grupo cujo inóculo foi de  $10^4$  CFU apresentou uma sobrevida de 80% no mesmo período analisado. No grupo controle a taxa de sobrevida foi de 100%. Tendo em vista que o inóculo de  $10^5$  CFU promoveu menor taxa de sobrevida, com diferença estatística em relação ao grupo controle, o mesmo representou maior gravidade e foi escolhido para os experimentos subsequentes.



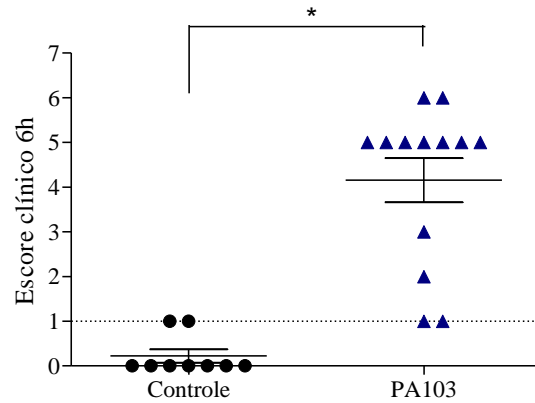
**Figura 7: Curva de sobrevivência após o desafio com *Pseudomonas aeruginosa* 103**

Camundongos C57BL/6 foram submetidos à instilação intratraqueal de  $10^4$  ou  $10^5$  CFU de PA103 e sua sobrevivência foi analisada diariamente por 7 dias. Animais controle foram instilados com 50  $\mu$ L de salina estéril apirogênica. No grupo pneumonia (PA103), os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de  $10^4$  ou  $10^5$  CFU da bactéria PA103. N=10 animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

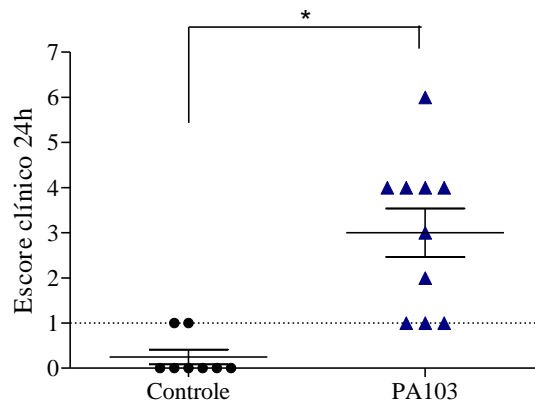
### **5.1.2 Análise do escore clínico de animais submetidos ao modelo experimental de pneumonia por instilação intratraqueal de *Pseudomonas aeruginosa* 103 (PA103)**

A próxima etapa dos experimentos consistiu em avaliar o nível de gravidade induzido pelo modelo utilizado. Para isso, nós utilizamos um escore clínico que levou em consideração alterações na aparência, fisiologia e comportamento dos animais (ver material e métodos) que indicam a presença de um quadro infeccioso. Os animais submetidos ao modelo de pneumonia apresentaram escore clínico elevado, indicando o desenvolvimento de sepse de moderada a grave, sendo mais predominante o quadro de sepse grave, tanto em 6 horas (figura 8A) quanto em 24 horas (figura 8B) após o desafio, quando comparados com o grupo controle.

**A**



**B**



**Figura 8 - Escore clínico de animais desafiados com *Pseudomonas aeruginosa* 103.** Camundongos C57BL/6 foram submetidos à instilação intratraqueal de 50  $\mu$ L contendo  $10^5$  CFU da bactéria PA103 e os sintomas clínicos foram analisados em (A) 6 horas e (B) 24 horas após indução de pneumonia. Animais controle foram instilados com 50  $\mu$ L de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia os animais receberam injeção intratraqueal de  $10^5$  CFU da bactéria PA103.  $9 \leq N \leq 12$  animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

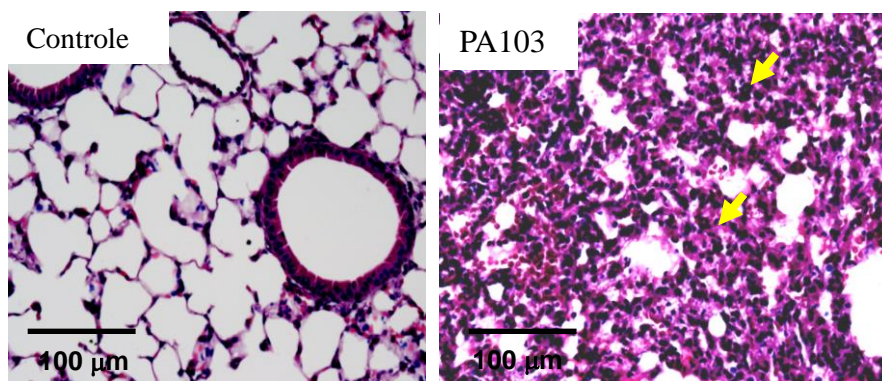
### **5.1.3.1 Análise de parâmetros inflamatórios no pulmão de camundongos C57BL/6 submetidos à instilação intratraqueal de PA103**

#### **5.1.3.1.1 Análise histopatológica do pulmão de animais C57/BL6 submetidos à instilação intratraqueal de PA103**

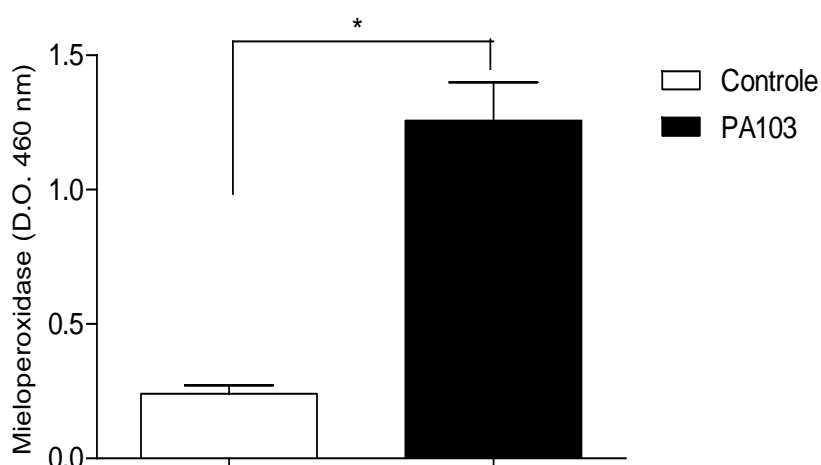
Para a avaliação qualitativa e da extensão da resposta inflamatória nesse modelo de pneumonia, foram analisados cortes histológicos do pulmão de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de PA103. Como pode ser observado na Figura 9A, cortes de tecido pulmonar apresentam um grande influxo de neutrófilos no espaço alveolar quando comparado com o grupo controle, seis horas após a instilação. Como bem estabelecido na literatura, os neutrófilos desempenham um papel importante na resposta inflamatória em infecções que acometem o ambiente pulmonar (Grommes e cols, 2011). Como mostrado na figura 9B, a instilação com  $10^5$  CFU de PA103 ocasionou um aumento significativo nos níveis teciduais de mieloperoxidase, 6 horas após a indução de pneumonia. A mieloperoxidase é uma enzima presente em grânulos de neutrófilos responsável pela geração de espécies oxidantes potentes (Malle e cols, 2006). Um aumento de sua atividade, portanto, pode acarretar um dano tecidual, sendo também uma medida indireta da presença de neutrófilos neste ambiente.



A



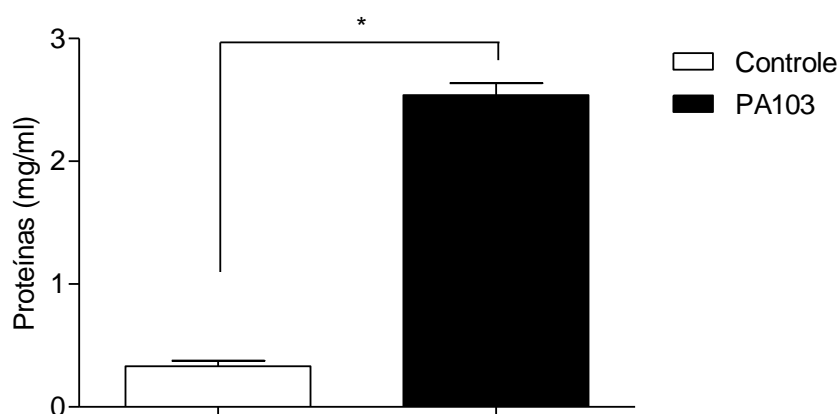
B



**Figura 9 - Análise histopatológica no pulmão de animais C57/BL6 submetidos à instilação intratraqueal de *Pseudomonas aeruginosa* 103.** (A) Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar no grupo controle e no grupo PA103 coradas com hematoxilina-eosina (HE). Fotos representativas de pelo menos 4 animais por grupo. Setas amarelas identificando neutrófilos. (B) Quantificação da enzima mieloperoxidase no tecido pulmonar. O grupo controle recebeu injeção intratraqueal de 50 µL solução salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103), os animais receberam injeção intratraqueal de 50 µL de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. Análises feitas 6 horas após a indução de pneumonia. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. N=8 animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### **5.1.3.1.2 Avaliação da formação de edema pulmonar em camundongos C57/BL6 instilados com PA103**

A fim de avaliar a formação de edema pulmonar na resposta inflamatória induzida pela bactéria PA103, camundongos C57/BL6 foram instilados com  $10^5$  CFU de PA103 e tiveram amostras do lavado broncoalveolar (BAL) coletadas para a quantificação dos níveis totais de proteínas pelo método BCA. Como podemos observar na figura 10, os animais desafiados com a bactéria PA103 apresentaram aumento significativo na quantidade de proteínas no BAL quando comparados com o grupo controle.

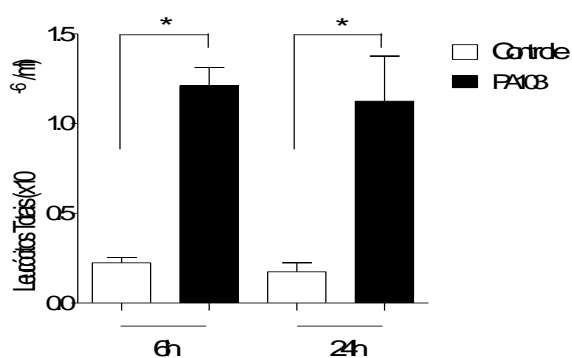


**Figura 10 - Avaliação da formação de edema pulmonar em animais desafiados com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* 103.** Camundongos C57BL/6 submetidos à instilação intratraqueal de 50  $\mu$ L contendo  $10^5$  CFU da bactéria PA103 tiveram amostras do BAL coletadas 6 horas após o desafio. A determinação do edema pulmonar foi feita pela análise do teor de proteínas totais presentes no sobrenadante pelo método de BCA. Os animais do grupo controle receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L solução salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. N=8 animais por grupo (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

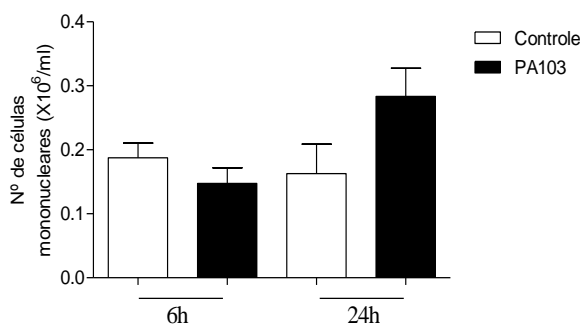
### **5.1.3.1.3 Análise da celularidade do BAL de camundongos C57BL/6 submetidos à instilação intratraqueal com PA103**

Uma das características da inflamação pulmonar é o aumento da presença de células inflamatórias no ambiente pulmonar. Decidimos, então, avaliar quantitativamente e qualitativamente a população de células recuperadas do BAL de animais estimulados com a bactéria PA103. Para isso, camundongos C57BL/6 foram instilados com  $10^5$  CFU de PA103 e 6 horas e 24 horas após o estímulo foram eutanasiados e o BAL coletado para contagem de leucócitos totais e determinação da contagem diferencial. Como pode ser observado nas figuras 11A, houve um aumento no número de leucócitos totais no BAL dos animais estimulados com PA103, tanto em seis quanto em vinte e quatro horas após o estímulo, sendo este aumento representado pela maior migração de células polimorfonucleares (figura 11C) no sítio da infecção, quando comparados com o grupo controle. Em 6 horas não houve diferença no número de células mononucleares, porém em 24 horas podemos observar uma tendência de aumento dessas células no BAL (figura 11B).

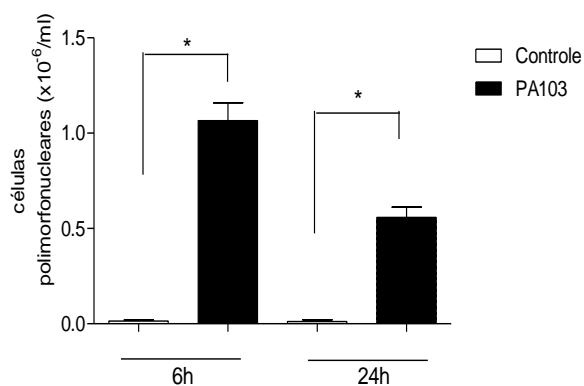
A



B



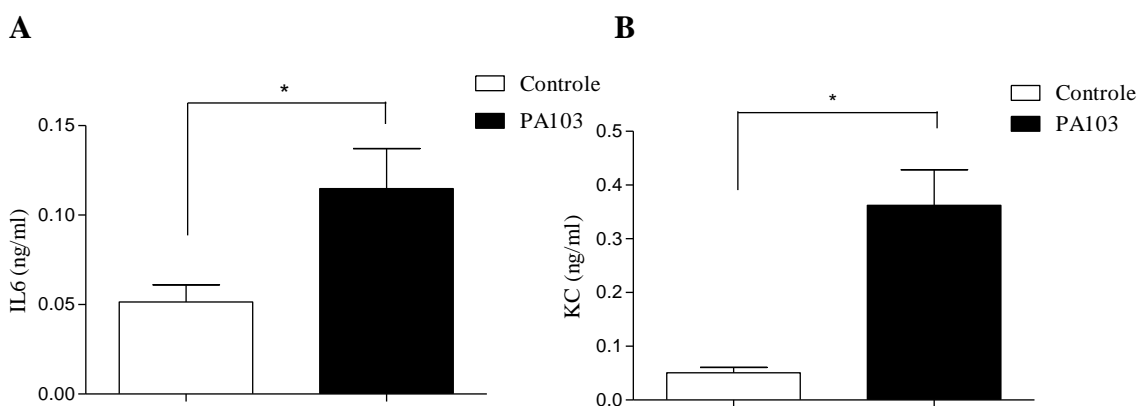
C



**Figura 11 - Análise da celularidade de amostras do BAL de camundongos C57BL/6 desafiados com PA103.** (A) Contagem de leucócitos totais, (B) células mononucleares e (C) células polimorfonucleares 6 horas e 24 horas após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de salina apirogênica e no grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. N=8 animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina.

#### **5.1.3.1.4 Avaliação dos mediadores inflamatórios no BAL de animais submetidos à instilação intratraqueal de PA103**

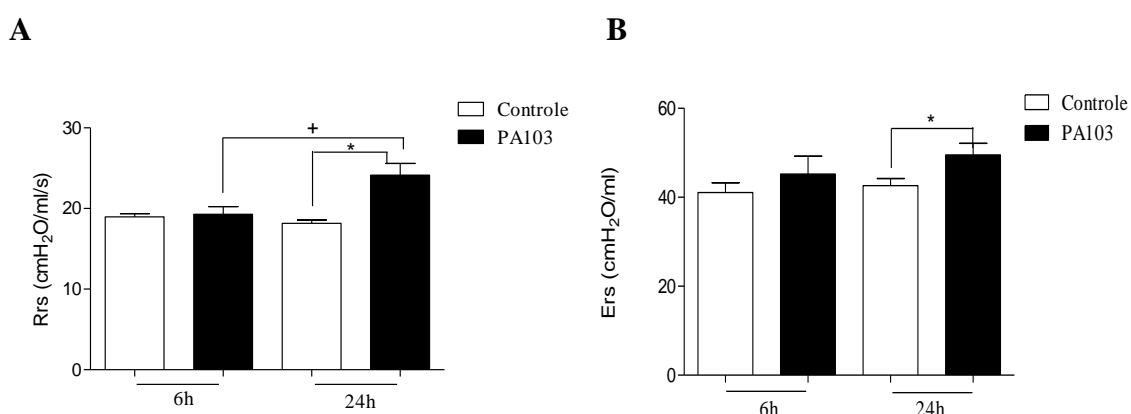
Outra característica importante da resposta inflamatória é a liberação de citocinas no local da infecção. Desta forma, utilizando o sobrenadante do BAL de animais desafiados com  $10^5$  CFU da bactéria PA103, foram quantificados os níveis de Interleucina-6 (IL-6) e quimiocina derivada de queratinócito (KC), 6 horas após a indução de pneumonia. Pode ser observado na figura 12 um aumento significativo tanto dos níveis da citocina IL-6 (figura 12A) quanto da quimiocina KC (figura 12B) quando comparados com o grupo controle.



**Figura 12 - Avaliação dos mediadores inflamatórios no BAL de animais desafiados com PA103.** (A) Níveis do mediador inflamatório Interleucina-6 (IL-6) em amostras do BAL 6 horas após o desafio com a bactéria PA103. (B) Níveis do mediador inflamatório quimiocina derivada de queratinócito (KC) em amostras do BAL, 6 horas após o desafio com PA103. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. N=8 animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### **5.1.3.1.5 Análise da mecânica pulmonar em animais instilados intratraquealmente com PA103**

Em formas mais graves de pneumonia como no caso da síndrome da angústia respiratória aguda (SRDA), é sabido que a função pulmonar está fortemente prejudicada devido às alterações estruturais no parênquima pulmonar. Para avaliar se o processo inflamatório observado até o momento no modelo utilizado era capaz de interferir na mecânica pulmonar foram avaliados a resistência e a elastância do pulmão através da utilização de ventilador mecânico, pelo qual foram coletados dados em 6 horas e 24 horas após a indução de pneumonia. Como podemos observar na figura 13, a instilação intratraqueal de  $10^5$  CFU de PA103 não foi capaz de promover alterações na função pulmonar com 6 horas após o estímulo. Em contrapartida, após 24 horas foram observados aumentos tanto na resistência (figura 13A) quanto na elastância (figura 13B) do pulmão nesses animais.



**Figura 13 - Análise da função pulmonar em animais desafiados com a bactéria PA103.**

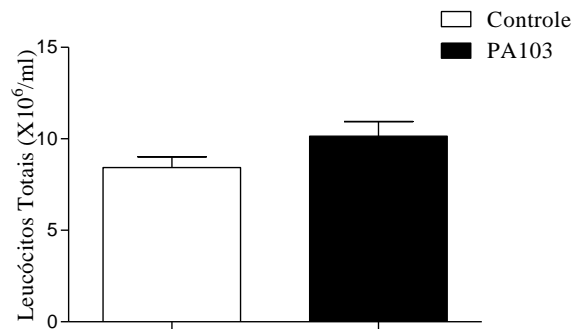
(A) A resistência e a (B) elastância pulmonares foram avaliadas 6 horas e 24 horas após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. N=8 animais por grupo. (\*) p<0,05 em relação ao grupo controle e (+) p<0,05 grupo PA103 24 horas em relação ao grupo PA103 6 horas.

### **5.1.3.2 Análise da resposta inflamatória sistêmica em camundongos C57BL/6 submetidos à instilação intratraqueal com PA103**

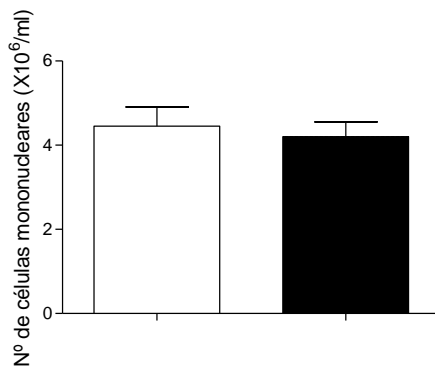
#### **5.1.3.2.1 Análise da celularidade no sangue de animais submetidos ao modelo experimental de pneumonia grave**

Decidimos avaliar quantitativamente e qualitativamente a população de células recuperadas do sangue periférico de animais deafiados com a bactéria PA103. Para isso, camundongos C57BL/6 foram instilados com  $10^5$  CFU de PA103 e 24 horas após o estímulo foram eutanasiados e amostras do sangue foram coletadas para contagem de leucócitos totais e determinação da contagem diferencial. Não foi observada alteração no número de células totais (figura 14A) e no número de células mononucleares (figura 14B) porém, como pode ser observado na figura 13C, houve um aumento no número de células polimorfonucleares no sangue dos animais estimulados com PA103 quando comparados com o grupo controle.

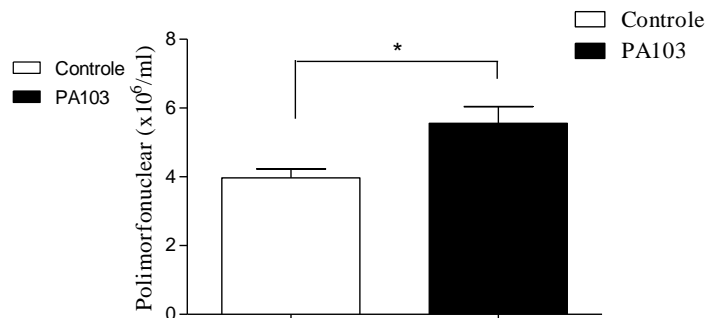
**A**



**B**



**C**

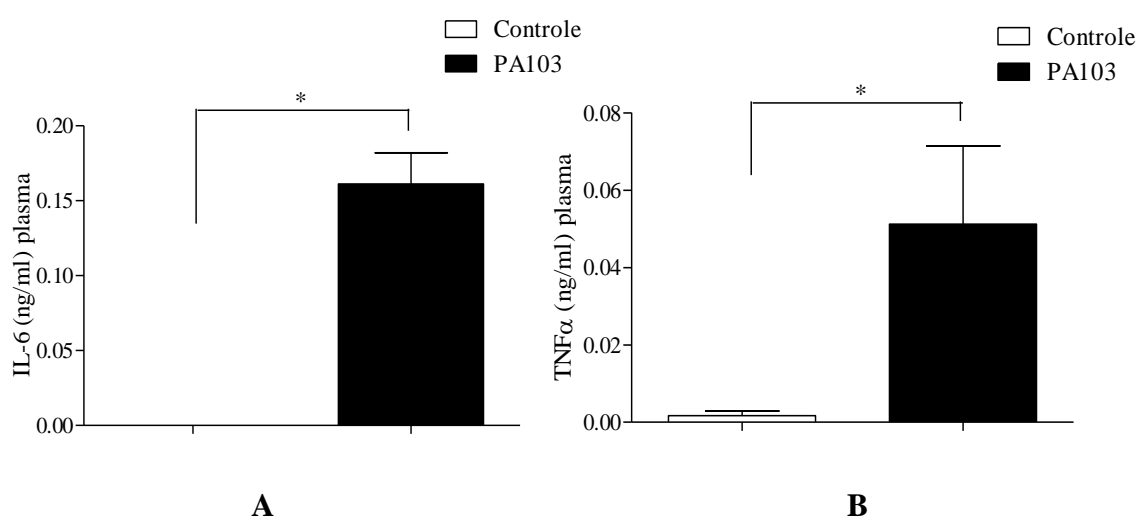


**Figura 14 - Análise da celularidade em amostras do sangue de camundongos C57BL/6 desafiados com a bactéria PA103.** (A) Contagem de leucócitos totais, (B) células mononucleares e (C) células polimorfonucleares 24 horas após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu\text{L}$  de salina apirogênica e no grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu\text{L}$  de  $10^5$  CFU PA103. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. N=8 animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina.



### **5.1.3.2.2 Avaliação dos mediadores inflamatórios no plasma de animais submetidos à instilação intratraqueal de PA103**

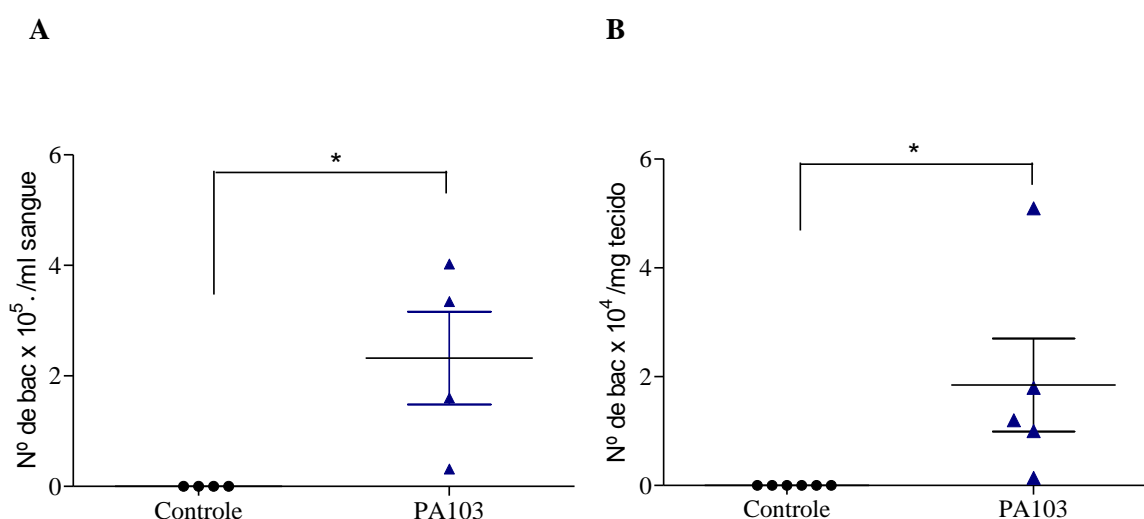
Uma vez que a presença de mediadores inflamatórios na circulação consiste em um dos parâmetros que caracterizam o quadro de sepse, decidimos avaliar os níveis de duas citocinas importantes envolvidas na sepse. Para isso, vinte e quatro horas após o desafio, amostras do plasma de camundongos C57BL/6 estimulados com a bactéria PA103 foram utilizadas para a quantificação de IL-6 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Podemos observar um aumento significativo dos níveis de IL-6 (figura 15A) e dos níveis de TNF- $\alpha$  (figura 15B) no plasma de animais desafiados com PA103 quando comparados com o grupo controle, 24 horas após o estímulo.



**Figura 15 - Avaliação de mediadores inflamatórios em amostras do plasma de animais desafiados com a bactéria PA103.** Níveis do mediador inflamatório (A) Interleucina-6 (IL-6) e do mediador inflamatório (B) fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) em amostras do plasma, 24 horas após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. N=8 animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 5.1.3.2.3 Análise da presença de bactérias no sangue e fígado de animais submetidos à instilação intratraqueal de PA103

Outra característica importante e que define o quadro de sepse é a presença de bactéria na circulação e em outro órgão que não àquele onde ocorreu a infecção inicial. Sendo assim, nosso próximo passo foi avaliar a presença de bactérias no sangue e no fígado de animais submetidos ao modelo de pneumonia. Para isso amostras de sangue e de tecido homogeneizado foram coletadas vinte e quatro horas após o desafio com a bactéria PA103. Os animais desafiados com a bactéria PA103 apresentaram tanto bactérias no sangue (figura 16A) quanto bactérias no fígado (figura 16B). Não foi possível observar presença de bactérias no sangue e fígado dos animais do grupo controle, conforme esperado.



**Figura 16 - Avaliação da presença de bactérias no sangue e no fígado de animais desafiados com a bactéria PA103.** (A) Quantificação de CFU no sangue, 24 horas após o desafio com a bactéria PA103. (B) Quantificação de CFU no fígado, 24 horas após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50 µL de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50 µL de 10<sup>5</sup> CFU da bactéria PA103. Dados representados como média ± erro padrão da média (n= 8). (\*) p<0,05 em relação ao grupo controle.

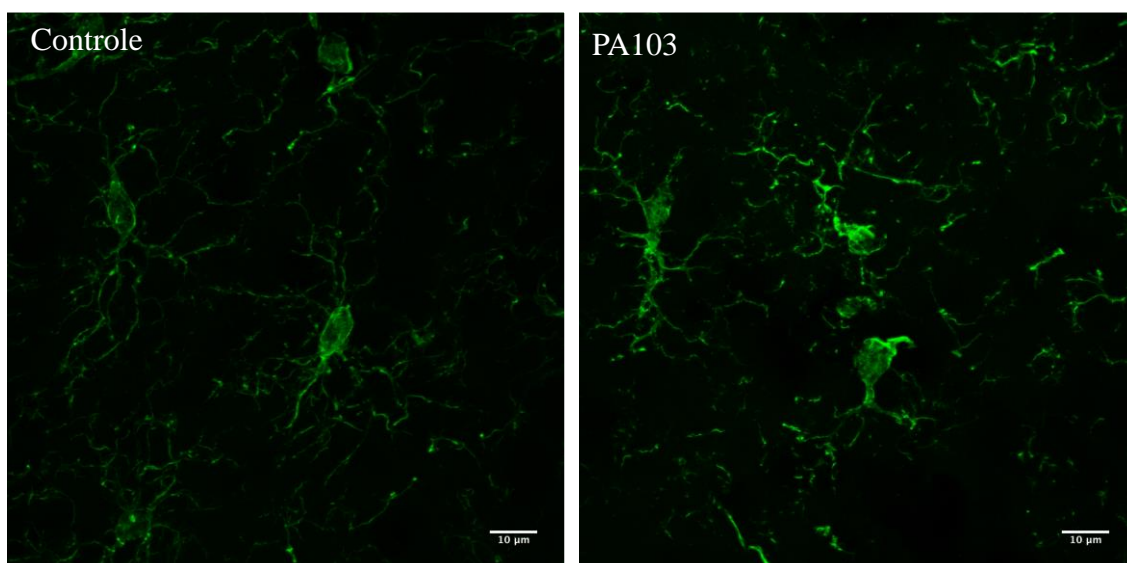
## **5.2 Caracterização dos efeitos agudos no cérebro de animais submetidos ao modelo de pneumonia grave**

### **5.2.1 Avaliação da ativação de microglia no cérebro de camundongos C57BL/6 após a instilação com PA103**

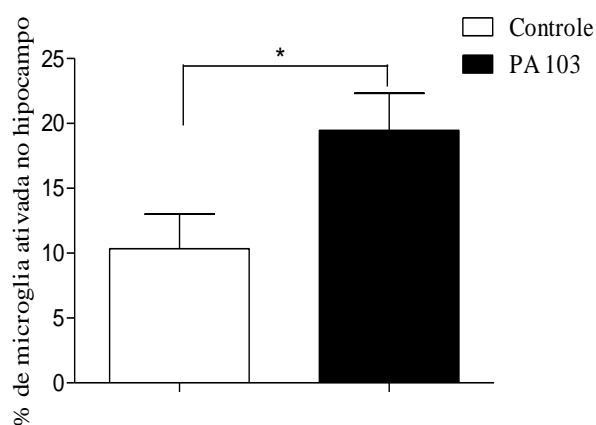
A avaliação da ativação de microglia foi realizada na região do hipocampo e na via migratória rostral (do inglês, *rostral migratory stream* ou RMS). No hipocampo, a ativação de microglia é essencial para o desenvolvimento de inflamação no SNC após inflamação sistêmica (Michels M. e cols, 2015). A RMS é uma região especializada por onde ocorre o tráfego de precursores neuronais e foi demonstrado que células imunes também estão estreitamente associadas a esta região (Mohammad M.G., 2014).

Houve um aumento na expressão de microglia ativada tanto no hipocampo (figura 17) quanto na RMS (figura 18) de animais instilados com a bactéria PA103, 24 horas após o estímulo, quando comparados com o grupo controle.

A



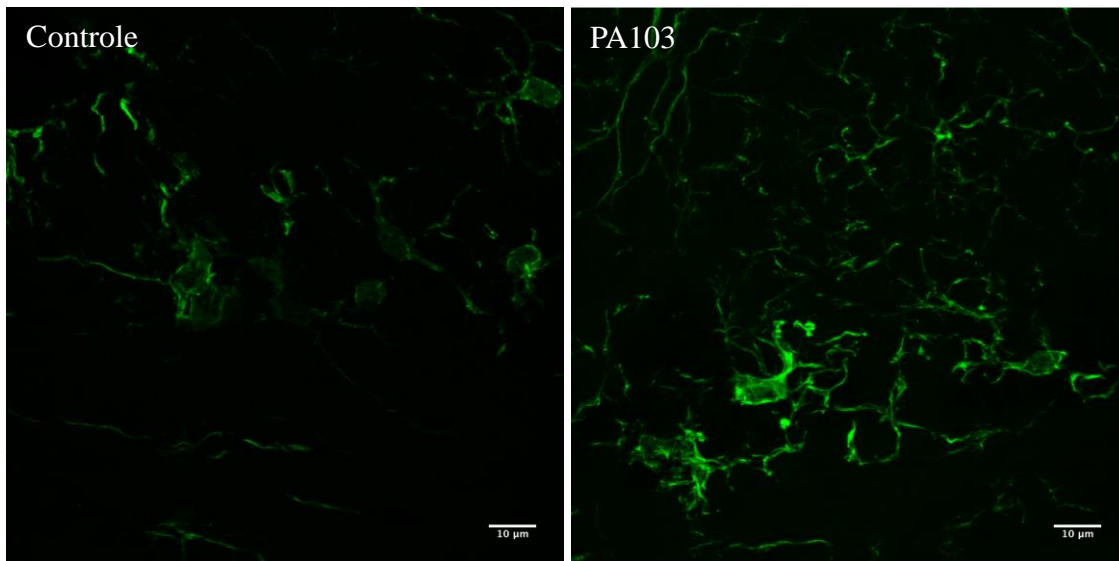
B



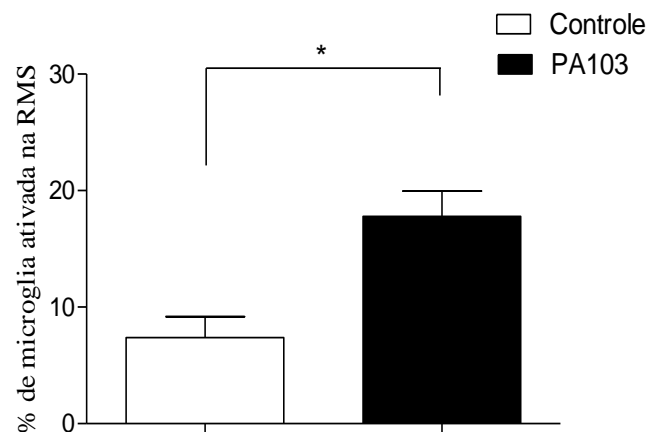
**Figura 17 - Avaliação da ativação de microglia no cérebro de camundongos C57/BL6 desafiados com a bactéria PA103**

(A) Fotomicrografias representativas da ativação de microglia no hipocampo 24 horas após o estímulo com a bactéria PA103. As imagens foram obtidas em microscópio confocal em aumento de 63X. (B) Percentual de microglia ativada na região do hipocampo, 24 horas após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50 µL de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50 µL de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. N=3 animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

A



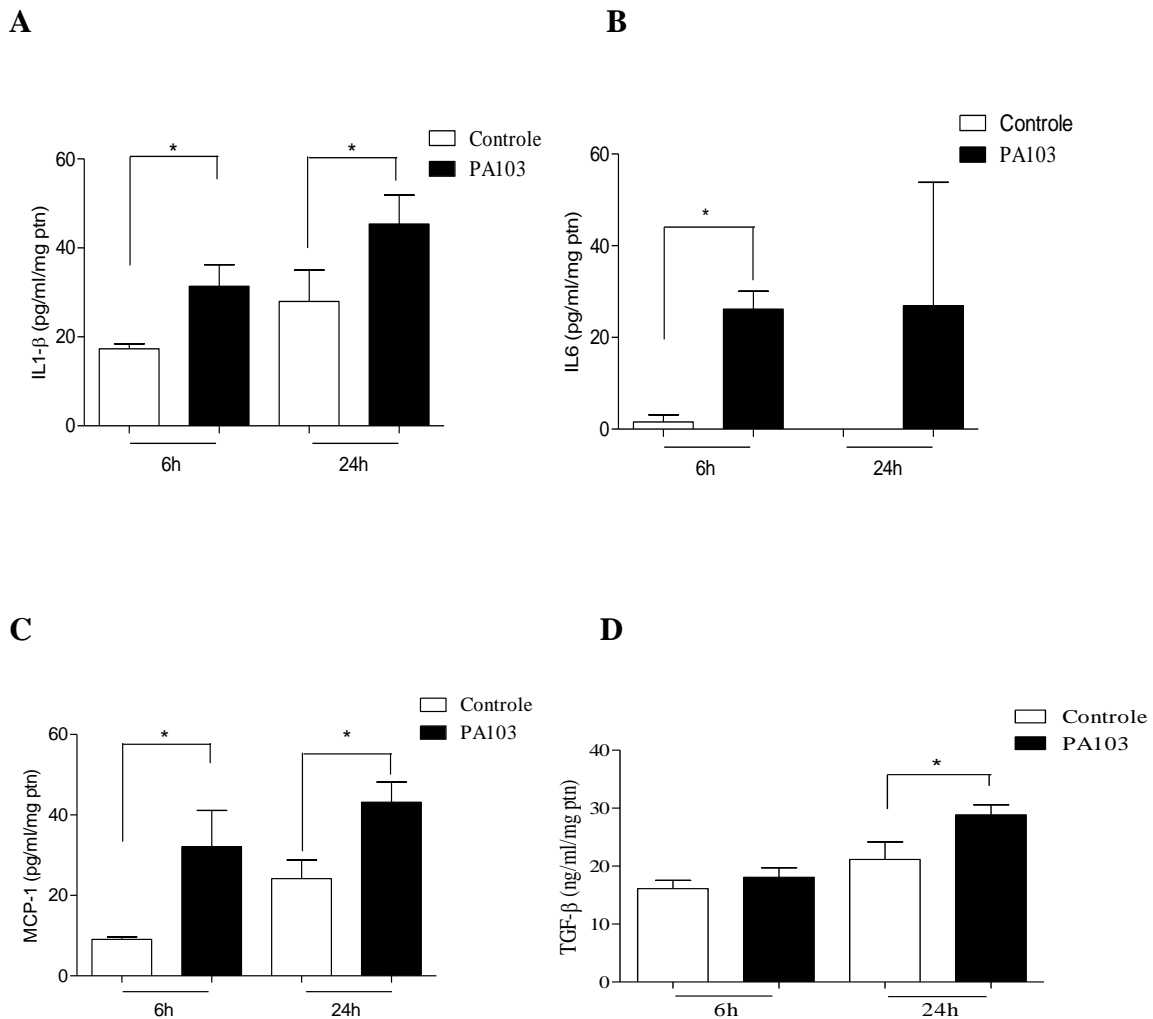
B



**Figura 18 - Avaliação da ativação de microglia no cérebro de camundongos C57/BL6 desafiados com a bactéria PA103.** (A) Fotomicrografias representativas da ativação de microglia na RMS 24 horas após o estímulo com a bactéria PA103. As imagens foram obtidas em microscópio confocal em aumento de 63X. (B) Percentual de microglia ativada na região da RMS, 24 horas após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50 µL de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50 µL de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média (n=3). (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. N=4 animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### **5.2.2 Determinação dos níveis de mediadores inflamatórios presentes no cérebro de animais C57BL/6 após a instilação com PA103**

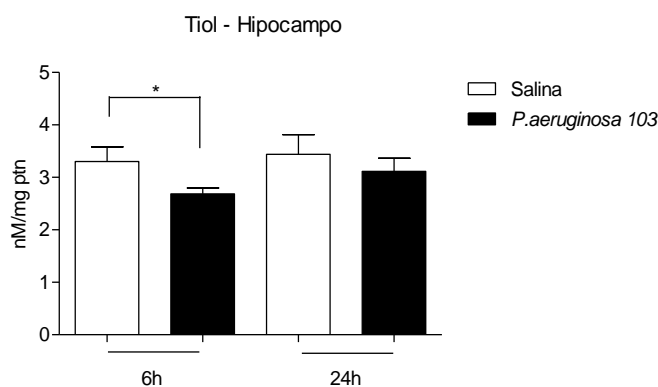
As concentrações de mediadores inflamatórios presentes no tecido cerebral de animais desafiados com a bactéria PA103 foram avaliadas. Para isso, o tecido cerebral foi coletado, homogeneizado e o sobrenadante coletado para quantificação dos mediadores. Os resultados revelaram um aumento significativo da citocina IL1- $\beta$  (figura 19A), em 6 horas e em 24 horas após o desafio com a bactéria PA103. A citocina IL-6 (figura 19B) apresentou aumento em sua concentração seis horas após o desafio com a bactéria PA103. Houve aumento da concentração da quimiocina MCP-1 (figura 19C) tanto em 6 quanto em 24 horas após o desafio e o mediador TGF- $\beta$  (figura 19D) apresentou concentrações elevadas somente vinte e quatro horas após o desafio quando comparados com o grupo controle.



**Figura 19 - Determinação dos níveis de mediadores inflamatórios presentes em amostras do tecido cerebral de animais desafiados com a bactéria PA103.** Níveis dos mediadores inflamatórios (A) Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), (B) Interleucina-6 (IL-6), (C) proteína quimiotática para macrófagos-1 (MCP-1) e (D) fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) em amostras do tecido cerebral, 6 horas e 24 horas após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de 10<sup>5</sup> CFU da bactéria PA103. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. N=8 animais por grupo. (\*) p<0,05 em relação ao grupo controle.

### **5.2.3 Avaliação dos níveis de tiol presente no hipocampo de animais C57/BL6 após a instilação com PA103**

Estudos demonstram que o mecanismo de estresse oxidativo desencadeado por espécies reativas parece ser de grande importância na patogênese da encefalopatia associada à sepse (Barichello e cols, 2006). Compostos tíóis possuem capacidade antioxidante, portanto, neutralizando espécies reativas e radicais livres. Sendo assim, os níveis de tíóis livres foram analisados em amostras do sobrenadante do macerado cerebral de animais que foram submetidos à instilação intratraqueal de PA103. Como podemos observar na figura 20, os animais que foram instilados com  $10^5$  CFU da bactéria PA103 apresentaram uma redução significativa de tíóis livres no hipocampo seis horas após o estímulo, indicando a presença de estresse oxidativo. Não foi possível observar aumento do consumo de tíóis livres em vinte e quatro horas após o desafio.

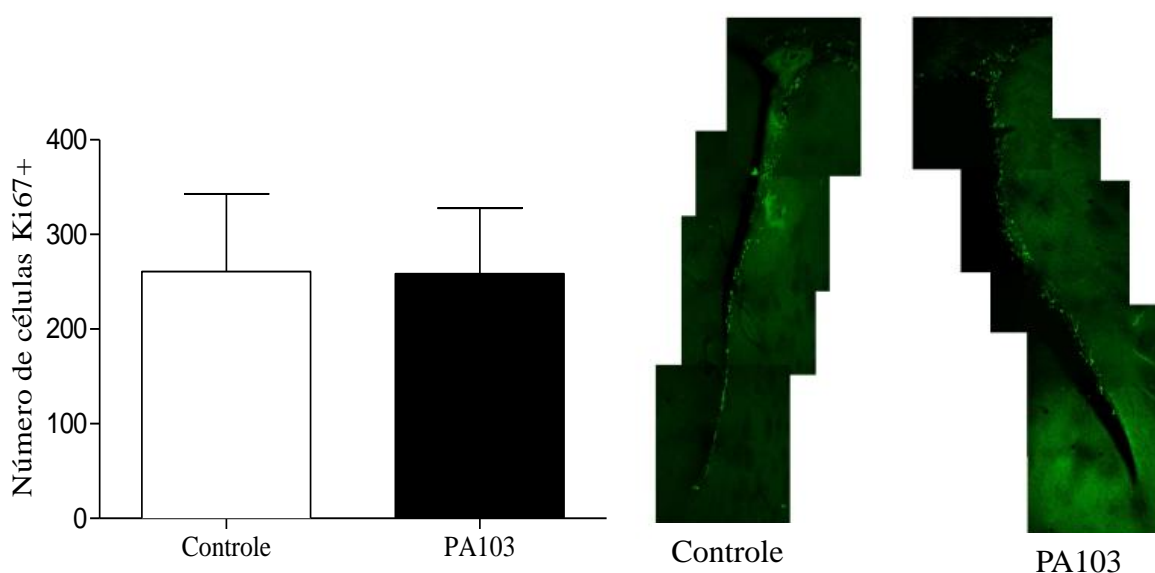


**Figura 20 – Tiol livre presente em amostras cérebro de animais desafiados com a bactéria PA103.** Níveis de tiol livre foram quantificados em amostras do hipocampo, 6 e 24 horas após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. N=8 animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.



#### **5.2.4 Avaliação da proliferação celular no cérebro de camundongos C57BL/6 após a indução de pneumonia grave**

Uma vez observado o aumento de citocina e estresse oxidativo, resolvemos avaliar se a capacidade de proliferação celular vinte e quatro horas após o estímulo foi alterada. Para isso, foi feita imunohistoquímica de cortes do tecido cerebral de animais desafiados com a bactéria PA103 para a proteína Ki67 que representa um marcador de proliferação celular. A quantificação de células marcadas positivamente para Ki67 foi realizada na região subventricular do ventrículo lateral. Como podemos observar na figura 21 não houve diferença na capacidade proliferativa de células nessa região entre os animais controle e os animais submetidos à pneumonia grave.

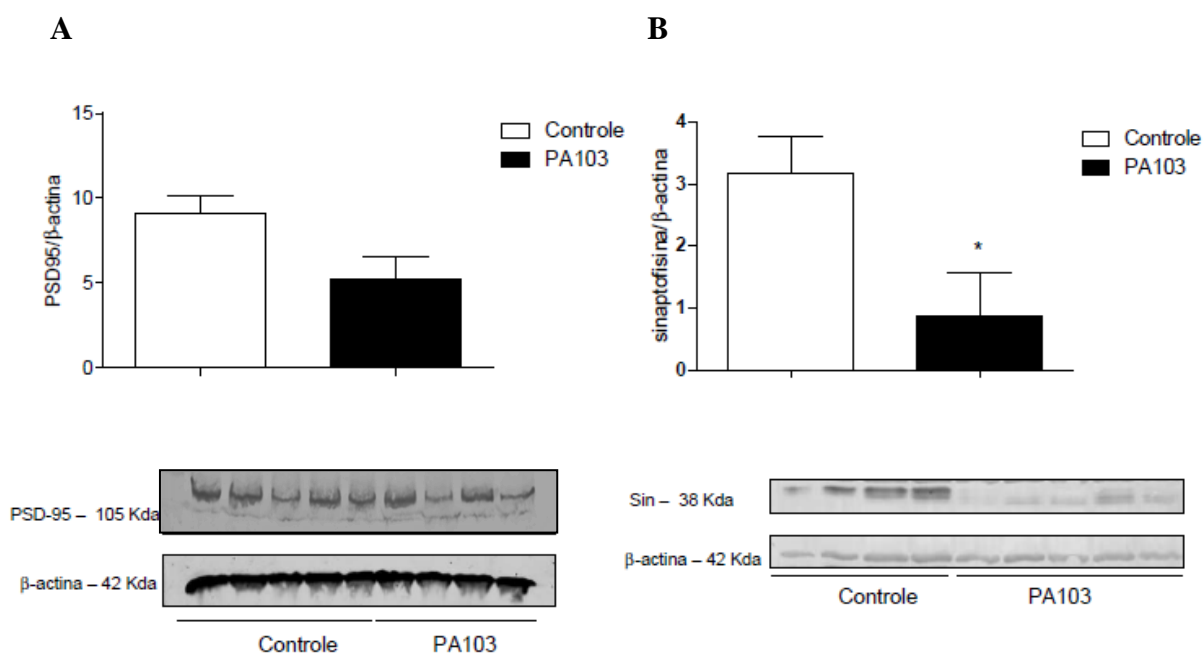


**Figura 21 - Proliferação celular no cérebro de animais desafiados com a bactéria PA103.**

Número de células Ki67 positivas (Ki67+), marcadas por imunohistoquímica (IHC), na região do ventrículo lateral 24 horas após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. N= 4 animais por grupo, imagens com aumento de 20X. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

### 5.2.5 Avaliação da plasticidade sináptica no cérebro de animais instilados com PA103 após a indução de pneumonia

Procuramos avaliar se a presença de neuroinflamação e estresse oxidativo nos animais desafiados com a bactéria PA103 se relacionava com a presença de déficit sináptico. Desta forma, foram analisados a expressão de marcadores pré-sináptico e pós-sináptico, como sinaptofisina e PSD-95. Para isso, camundongos instilados com a bactéria PA103 tiveram os cérebros perfundidos e coletados, e o hipocampo removido, 24 horas após o estímulo, para a realização do western blot. Como apresentado na figura 22, observamos uma tendência de redução da expressão da proteína pós-sináptica PSD95 (figura 22A), enquanto que houve alteração significativa da expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina (figura 22B) quando comparados com o grupo controle.

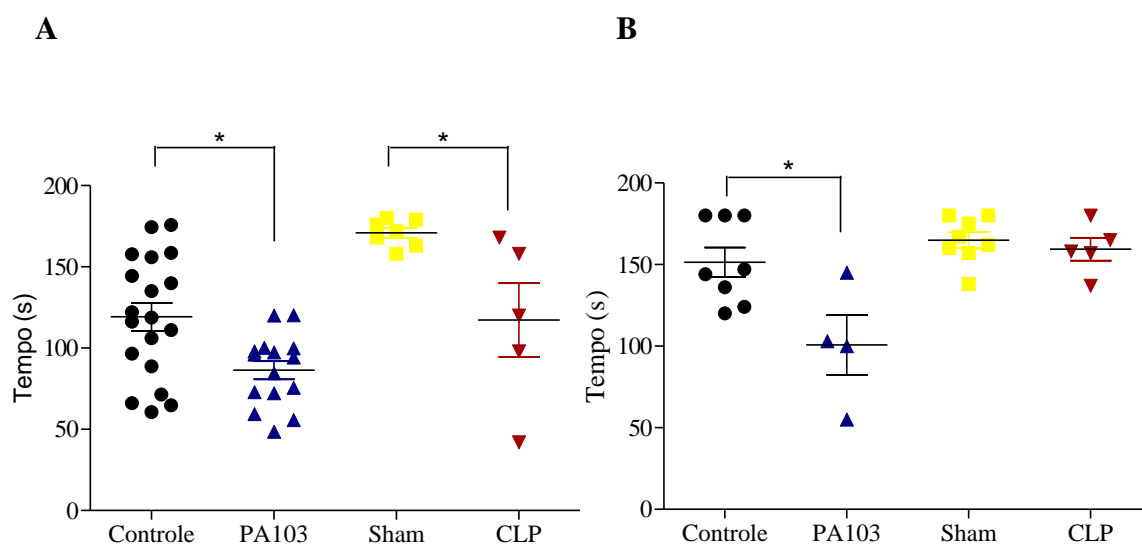


**Figura 22 - Expressão de proteínas sinápticas no hipocampo de animais desafiados com a bactéria PA103.** Membranas de western blot representativas e análise densitométrica da expressão de (A) proteína pós-sináptica PSD-95 e (B) proteína pré-sináptica sinaptofisina (Sin), 24 horas após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. O controle de carregamento consistiu na detecção da proteína  $\beta$ -actina. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média.  $4 \leq N \leq 5$  animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### **5.3 Avaliação das alterações no SNC em animais C57/BL6 submetidos aos modelos de pneumonia grave e CLP 30 dias após os estímulos**

#### **5.3.1 Avaliação dos efeitos sobre a memória aversiva de camundongos C57BL/6 submetidos aos modelos de pneumonia grave e CLP**

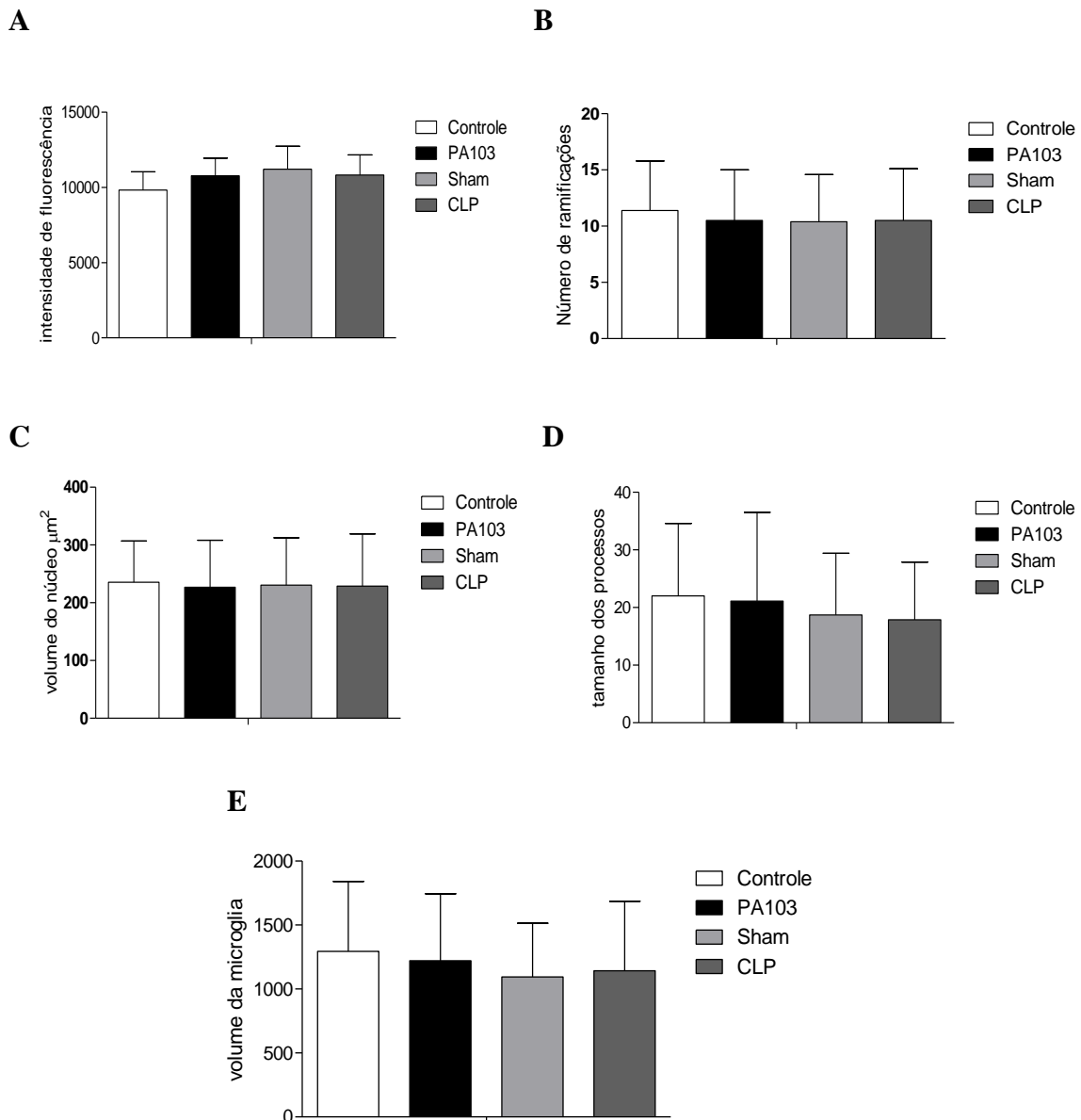
Uma das consequências da sepse em pacientes é o comprometimento de funções cognitivas. Essas alterações podem ser transitórias ou permanentes, e permanecer por até seis anos após a alta hospitalar (Khandaker e cols, 2011). Vários estudos têm demonstrado que animais sobreviventes ao CLP desenvolvem dano cognitivo, que em geral é transitório, retornando ao normal em torno de 30 dias após o processo infeccioso (Barichello e cols., 2005; Moraes C.A. e cols, 2014). Decidimos avaliar em nosso modelo de pneumonia com a bactéria PA103 e em paralelo no modelo de CLP, se os animais apresentavam alteração na função cognitiva. Como observado na figura 23A, os animais instilados com PA103 apresentam disfunção cognitiva, bem como os animais submetidos ao CLP, 13 dias após a cirurgia, quando avaliados pelo teste de *freezing*. De forma interessante, os animais submetidos ao modelo de pneumonia após 30 dias (figura 23B) da indução de pneumonia ainda apresentavam a perda da memória aversiva, sugerindo uma alteração irreversível dessa função, o que não foi observado com os animais submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana.



**Figura 23 – Função cognitiva de animais desafiados com a bactéria PA103 e de animais submetidos à sepse polimicrobiana.** Animais C57BL/6 foram submetidos ao teste freezing (A) 13 dias e (B) 30 dias após a indução de pneumonia (PA103) ou de sepse polimicrobiana (CLP). No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. No grupo com sepse polimicrobiana os animais foram submetidos ao modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP). Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média.  $4 \leq N \leq 19$  animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### **5.3.2. Avaliação morfológica da microglia no hipocampo de camundongos submetidos aos modelos de pneumonia grave e CLP**

Para avaliar se o padrão de neuroinflamação estava relacionado com a evolução do déficit cognitivo, sendo uma possível ativação prolongada da microglia uma das causas do déficit observado no modelo de pneumonia. Para isso as alterações morfológicas da microglia no dia 30 dias após a indução de pneumonia e de sepsé polimicrobiana foram avaliadas. Os seguintes parâmetros foram analisados: intensidade de fluorescência (figura 24A), número das ramificações (figura 24B), volume do núcleo (figura 24C), tamanho dos processos (figura 24D) e volume da microglia (figura 24E). Como podemos observar na figura 23 nenhum desses parâmetros se mostrou alterado em ambos os modelos experimentais.

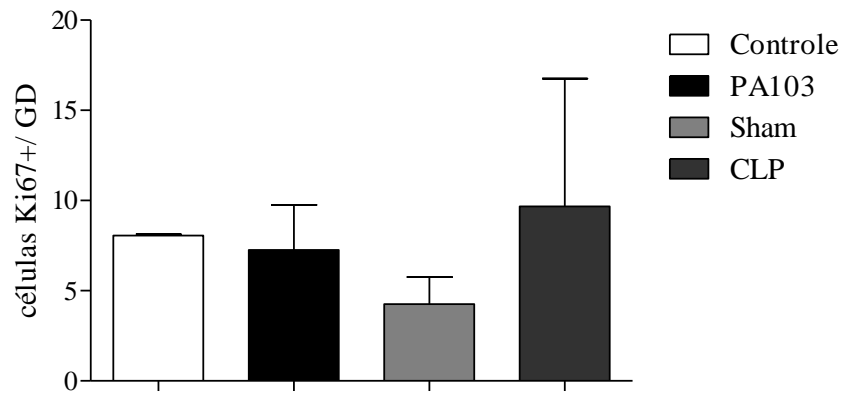
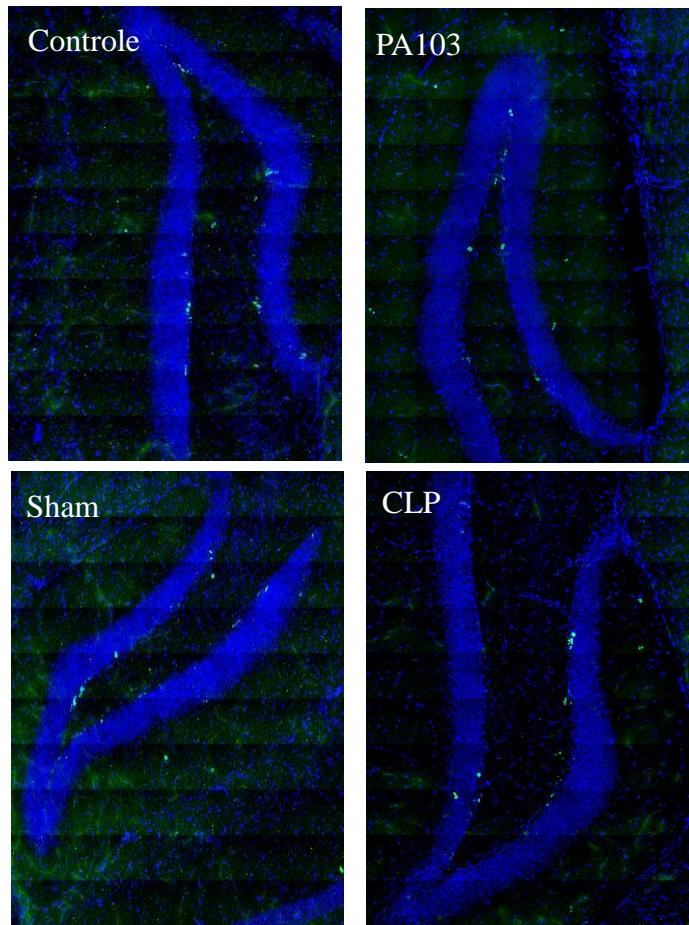


**Figura 24 – Morfologia da microglia no cérebro de animais desafiados com a bactéria PA103 e de animais submetidos à sepse polimicrobiana.** A morfologia da microglia de animais submetidos à pneumonia e à sepse polimicrobiana foi analisada 30 dias após os estímulos segundo os parâmetros: (A) intensidade de fluorescência, (B) número das ramificações, (C) volume do núcleo, (D) tamanho dos processos e (E) volume da microglia (E). No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50 µL de 10<sup>5</sup> CFU da bactéria PA103. No grupo com sepse polimicrobiana os animais foram submetidos ao modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP). Dados representados como média ± erro padrão da média. N=4 animais por grupo.

### **5.3.3 Avaliação da proliferação celular no cérebro de camundongos C57BL/6 submetidos aos modelos de pneumonia grave e CLP**

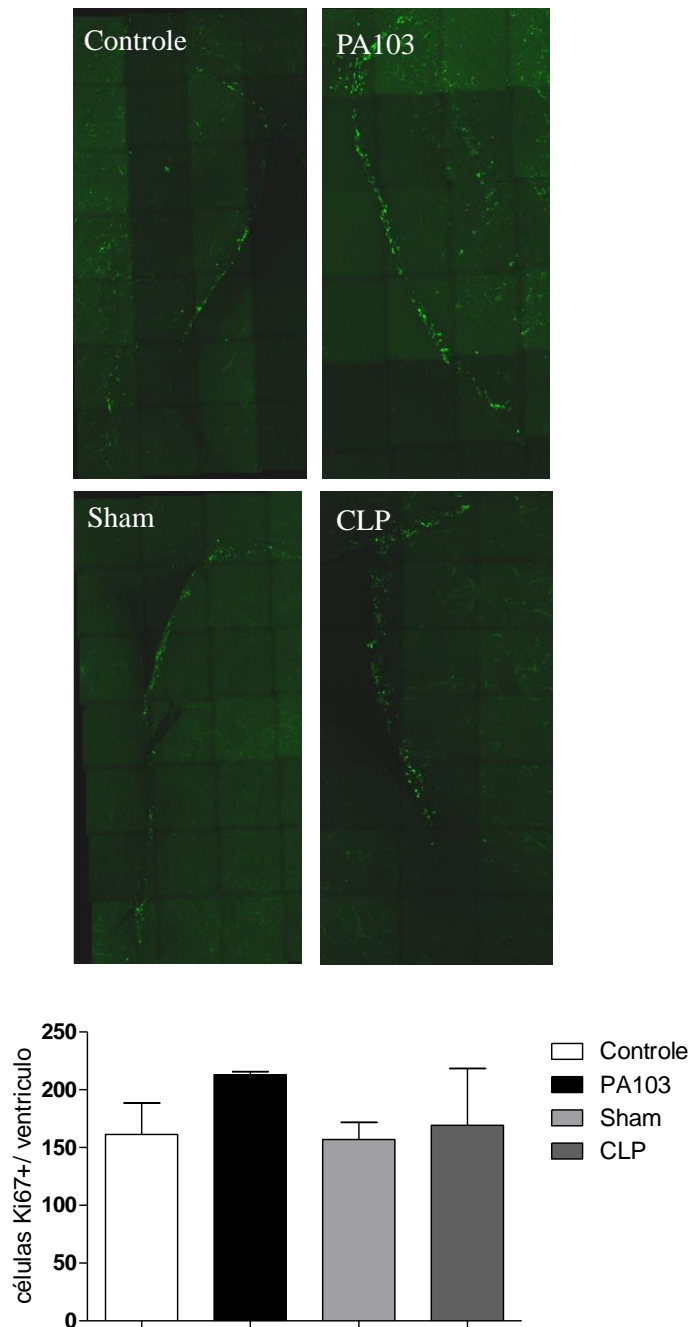
Resolvemos avaliar se a capacidade de proliferação celular, trinta dias após o estímulo, foi alterada. Para isso, foi feita imunohistoquímica de cortes do tecido cerebral de animais desafiados com a bactéria PA103 para a proteína Ki67 que representa um marcador de proliferação celular. A quantificação de células marcadas positivamente para Ki67 foi realizada na região subgranular do giro denteado no hipocampo. Como podemos observar na figura 25 não houve diferença na capacidade proliferativa de células nessa região em animais controle, submetidos à pneumonia grave, CLP e sham.

A





**B**



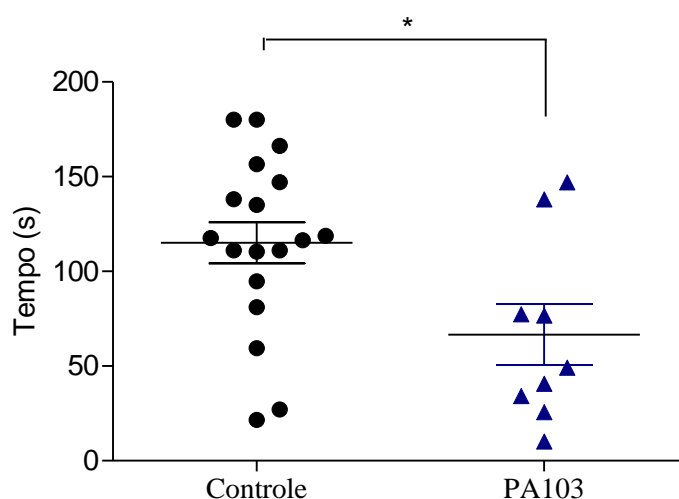
**Figura 25 - Avaliação da proliferação celular no cérebro de animais submetidos aos modelos de pneumonia grave e CLP**

Número de células Ki67 positivas (Ki67+), marcadas por imunohistoquímica (IHC), na região do giro denteado (GD) no (A) hipocampo e (B) ventrículo, 30 dias após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. N= 2 a 4 animais por grupo, imagens com aumento de 40X. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

## 5.4 Avaliação de alterações no SNC em camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de pneumonia grave 50 dias após o estímulo

### 5.4.1 Avaliação da perda de memória aversiva em camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de pneumonia grave 50 dias após a instilação

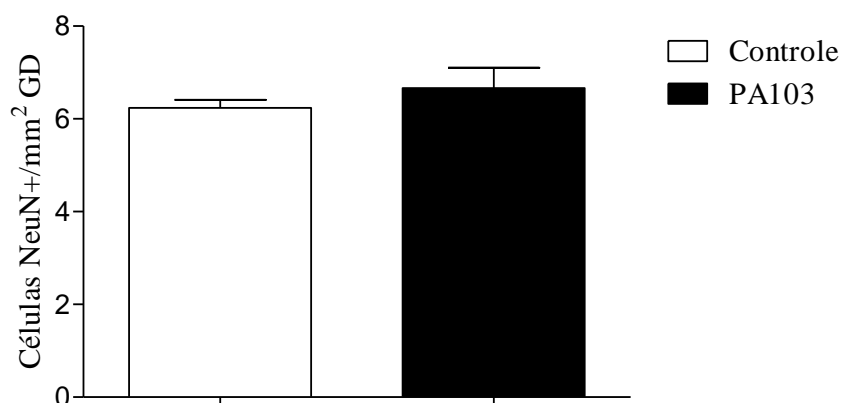
Uma vez que o déficit cognitivo nos animais submetidos ao modelo de pneumonia perdurou até o dia 30 após o estímulo, nós decidimos avaliar se os animais submetidos ao modelo de pneumonia apresentariam esse dano cognitivo em um tempo mais tardio. Como observado na figura 26, de forma interessante, os animais mesmo em 50 dias após a indução de pneumonia ainda apresentavam a perda da memória aversiva, sugerindo uma alteração irreversível dessa função, quando avaliado pelo teste de *freezing* e comparado com o grupo controle.



**Figura 26 – Função cognitiva em animais desafiados com a bactéria PA103.** Animais C57BL/6 foram submetidos ao teste freezing 50 dias após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média.  $9 < N < 17$  animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

#### **5.4.2 Quantificação de neurônios à longo-prazo no hipocampo de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de PA103**

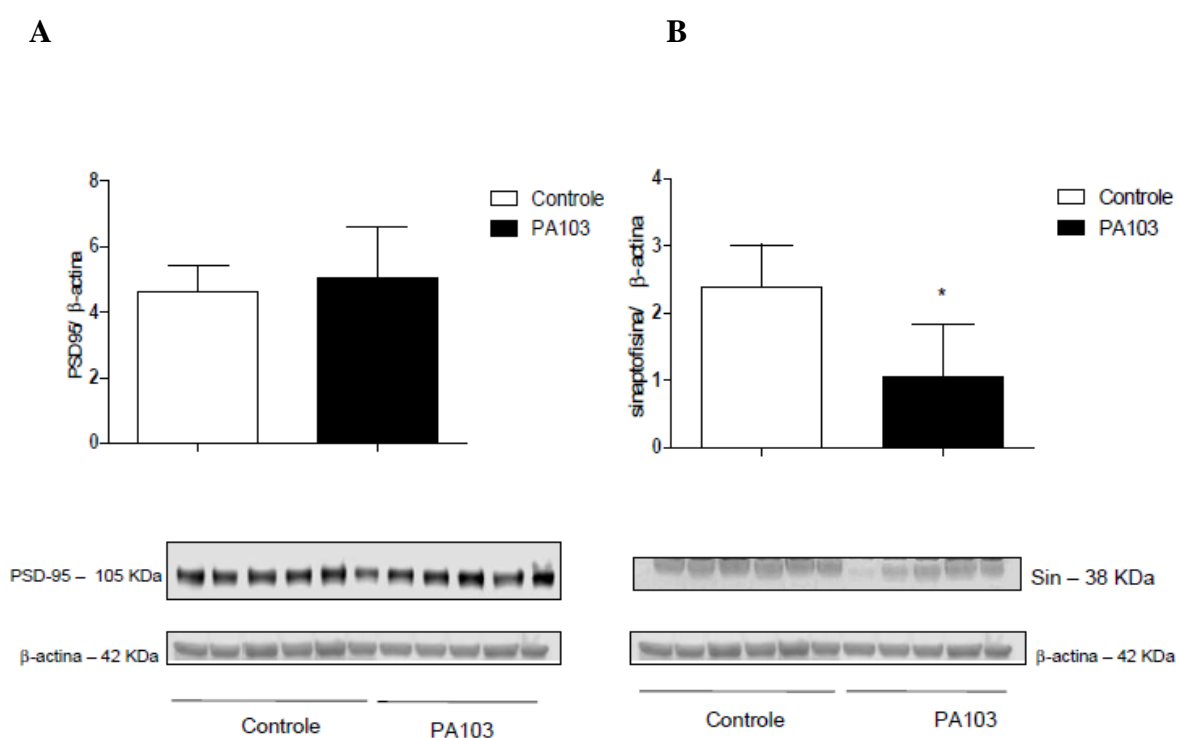
Uma vez observada a disfunção cognitiva e esta permanecendo por até 50 dias, resolvemos analisar as possíveis explicações desse dano em animais submetidos ao modelo de pneumonia grave por PA103. Para isso, foram feitas lâminas com seções de cérebro de animais instilados com PA103 retirado 50 dias após a infecção. Como podemos observar na figura 27 não houve diferença na quantificação de neurônios no hipocampo desses animais.



**Figura 27 – Quantificação neuronal no hipocampo de animais desafiados com a bactéria PA103.** A realização de imunohistoquímica foi feita para a detecção de NeuN do hipocampo, 50 dias após o desafio com a bactéria PA103. O número de células NeuN positivas (NeuN+) foi determinado por área na região do giro dentado. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. N=4 animais por grupo.

### 5.4.3 Avaliação da disfunção sináptica de longo prazo no cérebro de animais submetidos ao modelo de pneumonia grave

Para dar continuidade à investigação de possíveis causas do aparente dano cognitivo irreversível apresentado, decidimos avaliar aspectos das sinapses em animais submetidos ao modelo de pneumonia grave 50 dias após a cirurgia. Como podemos observar na figura 28 os animais que receberam instilação intratraqueal de PA103 não apresentaram alteração da expressão de proteína pós-sináptica PSD-95 no hipocampo, por outro lado podemos observar a perda sináptica representada pela redução da expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina.



**Figura 28 – Expressão de proteínas sinápticas no hipocampo de animais desafiados com a bactéria PA103.** Membranas de western-blot representativas e análise densitométrica da expressão de (A) proteína pós-sináptica PSD-95 e (B) proteína pré-sináptica sinaptofisina, 50 dias após o desafio com a bactéria PA103. No grupo controle, os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de salina estéril apirogênica. No grupo com pneumonia (PA103) os animais receberam injeção intratraqueal de 50  $\mu$ L de  $10^5$  CFU da bactéria PA103. O controle de carregamento consistiu na detecção da proteína  $\beta$ -actina. Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média.  $4 \leq N \leq 5$  animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

## **6. DISCUSSÃO**

Neste trabalho nós estabelecemos um modelo de pneumonia grave clinicamente relevante, onde foi possível observar alterações significativas no SNC, tanto de forma aguda quanto de forma crônica. Recentemente, foram analisadas, em um modelo de pneumonia similar ao empregado neste estudo, alterações da microcirculação cerebral após indução da pneumonia (Plotkowiski M.C. e cols, 2015), bem como foram observadas alterações precoces da microcirculação cerebral em pacientes com CAP (Rosengarten B. e cols, 2012). A relação entre pneumonia grave e declínio cognitivo a longo prazo tem sido explorada em estudos clínicos somente recentemente (Davydow D.S. e cols, 2013; Shah F.A. e cols, 2013) e portanto estudos experimentais que mostrem uma correlação entre pneumonia e dano cognitivo ainda são escassos.

Desta forma, na primeira parte deste trabalho, procuramos validar um modelo *in vivo* capaz de reproduzir a resposta inflamatória pulmonar observada em pacientes com pneumonia grave. Para isso, nós utilizamos em nosso modelo a instilação intratraqueal da cepa produtora de ExoU' de *P. aeruginosa* 103. Bactérias gram-negativas são notoriamente patógenos predominantes em pneumonias nosocomiais, e nas CAP, apesar de sua menor prevalência, estão associadas a alta taxa de mortalidade (Kang C.I. e cols, 2008; Falguera M. e cols, 2009). De uma maneira geral, as infecções por *P. aeruginosa* representam quadros de maior gravidade e pior prognóstico clínico (Sibila O. e cols, 2015; Arancibia F. e cols 2002).

Uma das principais estruturas associadas à interação patógeno-hospedeiro de bactérias gram-negativas compreende a maquinaria do sistema de secreção do tipo III (T3SS, do inglês *Type III Secretion System*). Esse complexo tem como característica principal seu formato de agulha e proteínas secretadas passam do citoplasma bacteriano para o citoplasma da célula do hospedeiro através desta estrutura. Proteínas que chegam à célula hospedeira através deste mecanismo de virulência têm papel crítico na patogênese da pneumonia e sepsis causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. De fato, um dos mais importantes fatores de virulência do T3SS dessas bactérias, a exotoxina ExoU', está associado à persistência bacteriana no pulmão com subsequente disseminação sanguínea, levando à cepas secretoras dessa citotoxina à condição de mau prognóstico do paciente (Schulert G.S. e cols, 2003).

Antes de iniciarmos as análises biológicas para a validação do modelo de pneumonia grave, nós realizamos um experimento de padronização onde foi analisada

uma curva de sobrevida e determinação da dose de bactérias necessária para induzir uma taxa de letalidade, semelhante à observada na clínica. Portanto, camundongos machos C57BL/6 foram submetidos à instilação intratraqueal com  $10^4$  ou  $10^5$  CFU de *P. aeruginosa* 103, tratados com antibiótico Meropenem (30 mg/kg – i.p.) e a sobrevida analisada ao longo de sete dias. A instilação de  $10^5$  CFU de PA103 determinou uma taxa de sobrevida de 40%, o que consideramos ideal para os experimentos subsequentes (ver figura 7).

Em nosso trabalho nós avaliamos o escore clínico dos animais 6 horas e 24 horas após a indução de pneumonia com a dose de  $10^5$  CFU de PA103, onde os mesmos apresentaram alta pontuação que correlacionou-se com uma maior gravidade do modelo (ver figura 8). A análise da gravidade de doença é amplamente utilizada na prática clínica e é fundamental para um maior entendimento do prognóstico dos pacientes. Diversos sistemas de escores como o APACHE II (do inglês *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*), SOFA (do inglês *Sequential Organ Failure Assessment*) e o PSI (do inglês *Pneumonia Severity Index*) foram desenvolvidos de maneira a ajudar na determinação do índice de gravidade do paciente internado (Knaus W.A. e cols, 1985; Fine M.J. e cols, 1997; Vincent J. e cols, 2000). Nesse contexto, sistemas de escore que possam ser aplicados em modelos animais com a finalidade, tanto de padronizar a gravidade quanto de corroborar estudos clínicos, vêm atualmente sendo descritos na literatura (Shrum B. e cols, 2014; Huet O. e cols, 2013).

Para darmos continuidade à caracterização de nosso modelo experimental, nós analisamos parâmetros histopatológicos do parênquima pulmonar, onde observamos um infiltrado abundante de neutrófilos e aumento da atividade da enzima mieloperoxidase no tecido pulmonar (ver figura 9). Em nosso trabalho, também foi possível observar o aumento significativo de neutrófilos no BAL de animais, tanto 6 horas quanto 24 horas após a indução de pneumonia (ver figura 11C). Evidenciando, assim, que em nosso modelo houve intensa migração de células para o ambiente pulmonar após a infecção.

A presença maciça de neutrófilos no tecido pulmonar é característico de formas graves de pneumonia, como aquelas que cursam a SDRA, onde durante o processo inflamatório, a ativação destas células acarreta a produção de uma variedade de mediadores citotóxicos. Dentre esses, o ácido hipocloroso é um poderoso agente oxidante e sua produção é dependente da enzima mieloperoxidase, presente nos grânulos dos neutrófilos. Como consequência, o aumento desta enzima pode levar ao dano tecidual, quando liberada pelos neutrófilos, e a avaliação de sua atividade pode ser

considerada uma medida indireta da presença dessas células no tecido. Além disso, estudos demonstram que ela também pode retardar o processo de apoptose nos neutrófilos e desta forma contribuir para a persistência da inflamação (El Kebir D. e cols, 2008).

Em nosso modelo nós observamos um aumento expressivo das proteínas no sobrenadante do BAL dos animais instilados com *P. aeruginosa* (ver figura 10), demonstrando assim, a formação de edema pulmonar. Esse resultado está de acordo com dados da literatura que mostram que o recrutamento de neutrófilos para o pulmão também está associado ao aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar durante a lesão pulmonar (Chignard M. e Baloy V., 2000).

Com relação a produção de mediadores inflamatórios nossos resultados mostraram um aumento dos níveis da citocina IL-6 (ver figura 12A) e da quimiocina KC (ver figura 12B) no sobrenadante do BAL 6 horas após a indução de pneumonia. A dinâmica da resposta inflamatória envolve a ativação inicial de células epiteliais e de macrófagos alveolares que irão secretar mediadores inflamatórios, tais como citocinas e quimiocinas, promovendo inflamação local e recrutamento de outras células do sistema imune, que por sua vez irão amplificar a resposta inflamatória (Moldoveanu B. e cols, 2009). A citocina IL-6 é regulada positivamente em diferentes modelos experimentais de sepse (Barkhausen T. e cols, 2011) e em pacientes críticos parece ser um fator preditivo de mortalidade (Agustí C. e cols, 2004). As quimiocinas exercem um papel importante na inflamação local, promovendo a migração dos leucócitos da circulação para os tecidos. A quimiocina KC (keratinocyte-derived chemokine) que é uma quimiocina murina homóloga a IL-8 humana, em particular, atua na quimiotaxia de neutrófilos para o sítio da inflamação e representa um dos fatores mais importantes envolvidos nesse evento. Nosso resultado corrobora com dados da literatura a respeito da indução de secreção de KC estimulada por ExoU' *in vivo* e *in vitro* (de Lima C.D. e cols, 2012) e está em conformidade com nossos dados de migração celular abordados anteriormente.

Uma vez observada uma intensa resposta inflamatória no pulmão 6 horas após a indução de pneumonia nós resolvemos avaliar se essa resposta era capaz de promover alterações na função pulmonar nesses animais. Nós analisamos a função pulmonar desses animais através da determinação da resistência e elastância do pulmão. Em nosso modelo nós pudemos observar um aumento tanto da resistência (ver figura 13A) quanto da elastância (ver figura 13B) pulmonares em 24 horas após a indução de pneumonia. O

aumento da resistência pode ser explicado pela presença massiva de neutrófilos nos espaços alveolares observada anteriormente em nossos resultados. A manutenção da elastância pulmonar está diretamente relacionada à capacidade de células epiteliais pulmonares, em especial os pneumócitos do tipo II, de produzir surfactante (Whittset J.A. e cols, 2002). Dentre as propriedades biofísicas dessa substância, está a redução da tensão superficial dos alvéolos, evitando o colapso dos mesmos (Hans S. e cols, 2015). Portanto, o aumento da elastância observado em nosso modelo mostra uma diminuição significativa da função pulmonar, sugerindo danos estruturais ao tecido pulmonar que podem incluir ocupação e colapso dos espaços alveolares, lesão de células epiteliais do tipo II, com consequente diminuição da produção de surfactante, e ruptura da barreira alvéolo capilar. De fato, diferentes estudos demonstram uma associação de alteração de proteínas surfactantes com o desenvolvimento de pneumonia grave (Quasney M.W. e cols, 2004; Lin Z. e cols, 2000; Ge L. e cols, 2016; Birkum A. A. e cols, 2015).

Prosseguindo na caracterização de nosso modelo, nós realizamos análises da resposta inflamatória sistêmica a fim de determinar se a indução de pneumonia grave por *P. aeruginosa* era capaz de se propagar para fora do compartimento pulmonar. Como esperado, não observamos presença de bactéria no sangue e no fígado dos animais controle. Porém, foi possível observar a presença de bactérias tanto no sangue (ver figura 16A) quanto no fígado (ver figura 16B) dos animais submetidos ao modelo de pneumonia grave 24 horas após o estímulo. Também foi possível observar em nosso modelo um aumento das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  (ver figuras 15A e 15B, respectivamente) no plasma dos animais 24 horas após a indução de pneumonia, sendo este aumento acompanhado de uma maior quantificação de células polimorfonucleares no sangue (ver figura 14B).

Frequentemente, o mau prognóstico de pacientes com pneumonia grave relaciona-se com a evolução da doença para sepse, choque séptico e disfunções orgânicas. Nestas situações, há liberação excessiva e desregulada de mediadores inflamatórios na circulação, ativação do sistema de coagulação, bacteremia, ou mesmo a presença de bactéria em outros sítios que não o da infecção inicial. Os níveis de IL-6 no plasma pode predizer o status da resposta inflamatória sistêmica de pacientes com trauma, bem como informar sobre o prognóstico dos mesmos (Giannoudis P.V. e cols, 2008). Em pacientes com SDRA, a IL-6 pode ser incluída como um biomarcador de gravidade e prognóstico (Agrawal A. e cols, 2012). Além disso, tanto a citocina IL-6 quanto TNF- $\alpha$ , foram demonstradas estar relacionadas com a morte precoce em pacientes



com CAP (Bacci M.R. e cols, 2015).

Vários estudos têm reportado que a cepa bacteriana produtora de citotoxina ExoU possui uma maior capacidade de aumento da permeabilidade vascular e de disseminação para outros órgãos (Machado G.B. e cols, 2010), o que corrobora nossos resultados das análises da presença de bactérias no sangue e no fígado após a indução de pneumonia (ver figura 16A e 16B).

O conjunto dos resultados discutidos até o momento consolidam um modelo de pneumonia grave relevante para as investigações posteriores.

O próximo passo foi avaliar se nosso modelo era capaz de promover alterações agudas no SNC. Diversos estudos têm demonstrado os efeitos da sepse no SNC, e foi visto que uma inflamação sistêmica sustentada pode afetar o cérebro, revelando a vulnerabilidade deste órgão à este tipo de injúria (Flierl M. e cols, 2010). Dentre as manifestações agudas da sepse pode-se destacar a encefalopatia associada à sepse (EAS) que pode ser uma manifestação precoce de disfunção orgânica.

A microglia é a célula residente representante do sistema imune no SNC. Sua ativação, portanto, pode ser apresentada como um dos parâmetros de neuroinflamação. Já foi demonstrado sua ativação na sepse em humanos (Lemstra A.W. e cols, 2007) e que sua ativação parece ser determinante tanto na EAS quanto no comprometimento cognitivo após a sepse (Michels M. e cols, 2015).

Sendo assim, a primeira etapa das análises em 24 horas após a indução de pneumonia consistiu na avaliação da ativação da microglia. Nossos resultados demonstraram uma ativação dessas células na região da RMS (Rostral Migratory Stream - rota migratória rostral) (ver figura 18A e 18B) e no hipocampo (ver figura 17A e 17B) do cérebro de animais submetidos ao modelo de pneumonia. A RMS é uma região de migração de precursores neuronais e recentemente foi demonstrada ser uma rota específica de ativação de microglia em outros modelos experimentais como o modelo experimental de malária cerebral e o modelo de encefalite autoimune experimental (EAE) (Mohammad M.G. e cols, 2014; Hoffman A. e cols, 2016). O hipocampo é uma região associada à memória e os efeitos da neuroinflamação na sepse nessa região têm sido amplamente estudados (Hoogland I.C. e cols, 2015).

No presente estudo, foi possível observar um aumento de IL-1 $\beta$  (ver figura 19A), IL-6 (ver figura 19B) e MCP-1 (ver figura 19C) em ambos os tempos de 6 horas e 24 horas após a indução de pneumonia e de TGF- $\beta$  (ver figura 19D) 24 horas depois do estímulo. Uma vez ativadas, as microglias podem secretar diferentes mediadores

inflamatórios perpetuando os efeitos da inflamação sistêmica no SNC (Michels M. e cols, 2014; Terrando N. e cols, 2010). Dessa maneira, nós decidimos avaliar os níveis dos mediadores IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 e TGF- $\beta$ . A citocina IL-1 $\beta$  está associada à alteração de parâmetros cognitivos após a sepse (Mina F. e cols, 2014) e pode levar a deficiência do potencial de longa duração também na sepse (Imamura Y. e cols, 2011). A IL-6 é positivamente regulada juntamente com a IL-1 $\beta$  e contribui para a perpetuação da resposta inflamatória no SNC após estímulo periférico.

O aumento de IL-1 $\beta$  e IL-6 no cérebro dos animais submetidos ao modelo de pneumonia indica a ativação da microglia, vista nos nossos resultados anteriores, para um perfil classicamente ativado, porém outras análises necessitam ser realizadas para comprovar essa hipótese. Contudo, já foi demonstrado que as microglias com perfil de resposta M1 secretam as citocinas IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em doenças neurodegenerativas (Tang Y. e cols, 2015; Moehle M.S. e cols, 2014).

A quimiocina MCP-1 foi demonstrada ter um aumento robusto no cérebro em modelo de endotoxemia onde seu pico de produção foi de 6 horas após o estímulo com LPS (Thompson W.L. e cols, 2008). Contudo, quando observada em microglias isoladas, essa quimiocina é capaz de regular a migração e proliferação dessas células, porém sem ocasionar dano neuronal (Hinojosa A.E. e cols, 2011). A alteração de citocinas anti-inflamatórias também pode levar a perturbações no funcionamento do cérebro. Por exemplo, camundongos transgênicos que têm aumento da expressão constitutiva de IL-10 apresentam déficits de aprendizado (Meyer U. e cols, 2008). Com relação ao TGF- $\beta$ , dados na literatura mostram o aumento de após estímulo com LPS, em concordância com nossos dados observados para esse mediador (Semmler A. e cols, 2008).

Para darmos continuidade as análises dos parâmetros neuroinflamatórios no modelo de pneumonia grave, nós avaliamos a ocorrência de estresse oxidativo através da quantificação de tióis totais no cérebro. Foi possível observar uma diminuição dos níveis de tiol livre no hipocampo 6 horas após a indução de pneumonia (ver figura 20), o que indica a presença de estresse oxidativo no tecido cerebral desses animais. Compostos tiol atuam como antioxidantes e o consumo desses compostos livres representa uma medida de estresse oxidativo. Está descrito na literatura o acúmulo de marcadores de stress no SNC tanto na sepse (Comim C.M. e cols, 2011; Bozza F.A. e cols, 2013; Hernandez M.S. e cols, 2014) quanto em outros modelos experimentais de

infecção (Reis P.A. e cols, 2010).

Em seguida, nós decidimos avaliar se os efeitos da neuroinflamação observada anteriormente eram capazes de promover alterações na proliferação celular no cérebro desses animais. Agudamente, nossos resultados não demonstraram diferenças na quantificação de células Ki67 positivas ao longo da zona subventricular do ventrículo lateral (SVZ) (ver figura 21). A quantificação de células ki67 positivas também foi feita 30 dias após o estímulo, em ambos os modelos utilizados, na região do giro denteado. Neste contexto, não também não houve alteração no número de células ki67 positivas, porém houve uma tendência de aumento da proliferação no grupo CLP (ver figura 25). A região SVZ, juntamente com o giro denteado no hipocampo, é estabelecida como um dos sítios primários de neurogênese no adulto. Estudos demonstram que alterações do volume do hipocampo estão relacionadas à alterações da função cognitiva em pacientes com comprometimento cognitivo e doença de Alzheimer (Peng G.P. e cols, 2015). Poucos trabalhos mostram os efeitos da sepse na proliferação celular no cérebro, no entanto, um estudo em modelo de CLP em ratos mostrou haver um aumento da neurogenese na região SVZ, o mesmo não ocorrendo na região do giro denteado (Bakirci S. e cols, 2011). Atribui-se a essa maior proliferação a tentativa do SNC de compensar os efeitos danosos da sepse, o que não foi observado em nosso modelo.

Uma vez que observamos que nosso modelo de pneumonia foi capaz de promover alterações importantes relacionadas à neuroinflamação, nós decidimos avaliar se essas alterações poderiam induzir efeitos tardios nesses animais. Desta maneira, nós decidimos avaliar o comprometimento cognitivo a longo prazo em nosso modelo de pneumonia e comparar com um modelo de sepse polimicrobiana por CLP. A função cognitiva nesses modelos foi avaliada 13 e 30 dias após a indução de pneumonia e pôde-se observar que no modelo de pneumonia a perda de memória aversiva persiste até o dia 30 (ver figura 23B), diferentemente do modelo de CLP, onde há recuperação do dano visto com 13 dias (ver figura 23A).

Está descrito que diferentes modelos de sepse são capazes de promover comprometimento cognitivo a longo prazo. A maior parte dos estudos utiliza um modelo de injeção de LPS ou o modelo de CLP para indução de sepse e posterior análise da função cognitiva. Poucos estudos até o momento utilizaram um modelo de pneumonia para avaliar tais parâmetros. As respostas frente a esses estímulos variados, tanto de sepse quanto de outras doenças neuroinflamatórias se mostraram diferentes dependendo do modelo utilizado, do animal, do estímulo e dos tempos analisados. Portanto, a

caracterização dos efeitos no SNC em modelos que mimetizem a resposta vista na prática clínica é de grande importância. Dados na literatura são controversos com relação à perda de memória a longo prazo. Estudos do nosso grupo demonstraram (Moraes C.A. e cols, 2014), em concordância com nossos dados, que há recuperação da perda cognitiva em animais submetidos ao modelo de CLP 30 dias após a indução de sepse. Outro estudo recente, em modelo de sepse branda por CLP, demonstrou que no dia 50 pós-sepse, os animais não apresentaram alterações na aquisição de memória, porém permaneciam com comprometimento na extinção de memória (Singer, B.H. e cols, 2016). Por outro lado, outros estudos demonstraram ainda haver perda cognitiva 30 dias após a indução de CLP em ratos (Schwalm M. e cols, 2013; Michels M. e cols, 2015). E de maneira interessante, outro estudo demonstrou que uma única injeção de LPS foi capaz de causar efeitos no comportamento depressivo e de ansiedade nos animais a longo-prazo (Anderson e cols, 2015). Deve-se levar em consideração, contudo, além do modelo, o tipo de teste cognitivo realizado, bem como a gravidade da sepse observada.

Nós também decidimos comparar a ativação de microglia tardiamente entre os modelos através da observação de sua morfologia. Além da intensidade de fluorescência foram analisados parâmetros morfológicos, tais quais, o volume total, tamanho dos processos, volume do núcleo e tamanho das suas ramificações. Nesse contexto, nós não observamos ativação de microglia em ambos os modelos (ver figura 24). No mesmo estudo onde foi demonstrado o comprometimento da extinção de memória no modelo de sepse branda foi demonstrado que não há ativação de microglia tardiamente, porém o perfil de expressão gênica dessas células se mostrou alterado tardiamente (Singer, B.H. e cols, 2016). Talvez, seja interessante também analisarmos o transcriptoma dessas microglias em ambos os modelos, mesmo não havendo diferenças em sua morfologia.

Uma vez que observamos alteração cognitiva com 30 dias, nós decidimos dar continuidade a essa análise em nosso modelo de pneumonia, portanto avaliando o comprometimento cognitivo 50 dias após o estímulo infeccioso. O modelo utilizado provocou comprometimento cognitivo significativo até 50 dias (ver figura 26). Nossos resultados sugerem que o comprometimento cognitivo observado após a indução de pneumonia pode ser irreversível. Alguns estudos já demonstraram no modelo de CLP ou de endotoxemia um comprometimento cognitivo à longo prazo, relacionando com mediadores inflamatórios, estresse oxidativo, metabolismo energético e neuroinflamação (Comim C.M. e cols, 2011; Steckert A.V. e cols, 2013; Schwalm M.T.

e cols, 2013). Um mecanismo que parece estar associado à perda de memória a longo prazo na sepse parece ser a ativação da enzima óxido nítrico sintase induzida, uma vez que foi demonstrado que camundongos knockout para esta enzima e submetidos ao modelo de injeção de LPS não apresentaram danos cognitivos até 2 meses após o estímulo (Weberpals M. e cols, 2009). Com relação ao envolvimento pulmonar, um estudo demonstrou comprometimento do aprendizado e de memória em um modelo de asma crônica com destruição da estrutura sináptica e alterações de LTP (Guo R.B. e cols, 2013).

Uma vez que observamos uma perda aparentemente irreversível de memória, nós procuramos quantificar as células neuronais na região do giro dentado no hipocampo dos animais submetidos ao modelo de pneumonia no tempo de 50 dias após a infecção. Em nossos resultados não foi possível observar alteração no número de células neuronais na região investigada (ver figura 27). O hipocampo é uma região importante no processo de formação de memória. De fato, o mecanismo de perda de memória foi demonstrado, em alguns casos, estar associado à morte neuronal nessa região (Semmler e cols, 2007).

A relação entre infecção, neuroinflamação e disfunção cognitiva tem sido recentemente demonstrada tanto em estudos clínicos quanto em estudos experimentais. Em sua maioria, esses estudos foram realizados em pacientes sobreviventes de sepse, ou em modelos experimentais de sepse (Perl T.M. e cols, 1995; Sharshar T. e cols, 2007; Bozza F. e cols, 2010; Semmler A. e cols, 2013). Adicionalmente, está bem demonstrado, que a encefalopatia associada à sepse, bem como o dano cognitivo observado em pacientes críticos estão associados a uma maior morbidade e mortalidade (Nguyen e cols, 2006).

Dando prosseguimento as investigações, nós avaliamos se a pneumonia grave teria um efeito sobre as proteínas sinápticas agudamente. Para isso, nós avaliamos a presença de sinaptofinina e PSD-95 (proteínas pré e pós sinápticas, respectivamente) no hipocampo desses animais. A indução de pneumonia mostrou ter efeito significativo na diminuição de sinaptofinina (ver figura 22B), bem como uma tendência à níveis mais baixos de PSD-95 em 24 horas após a indução da pneumonia (ver figura 22A). Em seguida, nós decidimos avaliar se, com 50 dias após a infecção, ainda era possível observar as alterações sinápticas observadas agudamente. De maneira interessante, nossos resultados revelaram que há uma recuperação dos níveis de proteína pós sináptica PSD-95, porém a perda de sinaptofinina se mantém até o tempo analisado (ver

figura 28). Esses resultados indicam que a perda de memória aversiva observada pode estar relacionada ao decréscimo da função sináptica nesse modelo, estando de acordo com dados de Moraes e colaboradores, que também observou diminuição somente de sinaptofisina em um modelo de CLP (Moraes C. e cols, 2014).

O PSD-95 é a proteína mais abundante de terminais pós sinápticos (Cheng e cols, 2006) e está associada a estabilidade sináptica durante a LTP (Meyer D. e cols, 2014). A sinaptofisina é uma glicoproteína localizada em vesículas sinápticas na membrana dos terminais pré sinápticos de neurônios e tem função no tráfego de membrana (Evans & Cousin, 2005). Estudo prévio *in vitro* demonstrou que o óxido nítrico proveniente da microglia ativada promoveu uma deficiência no transporte axonal de precursores de vesículas sinápticas (Stagi M. e cols, 2005).

Apesar de bem caracterizado, do ponto de vista clínico, ainda não estão claros os mecanismos por trás do comprometimento cognitivo de longo prazo observado em pacientes sépticos. Diversos mecanismos vêm sendo relacionados com o dano cognitivo de longo prazo na sepse, e acredita-se que não apenas um, mas sim um conjunto desses fatores contribua para essa seqüela. Foi visto que sobreviventes de sepse apresentam lesões na substância branca cerebral (Morandi e cols, 2012; Semmler e cols, 2013). Fatores como, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, neuroinflamação, disfunção endotelial e quebra da BHE estão entre os mais estudados e terapias para prevenir ou reverter reverter tais efeitos também vêm sendo estudadas (Barrichello e cols, 2007; Yokoo e cols, 2012; d'Ávila e cols, 2008). No entanto, o estudos que associem disfunção sináptica e neurogênese com os efeitos crônicos no SNC na sepse ainda são escassos. Nosso estudo, portanto, apresenta um modelo de pneumonia grave possivelmente capaz de promover um comprometimento cognitivo permanente. Adicionalmente, as evidências de alterações no SNC no modelo abordado proporciona mais uma ferramenta, clinicamente relevante, para o estudo do comprometimento cerebral observado em neuropatologias, em especial as que envolvem a interação entre resposta inflamatória periférica e SNC.

## **7. CONCLUSÕES**

- O modelo de pneumonia promoveu uma alta mortalidade e alta gravidade;
- O modelo de pneumonia grave estabelecido no presente trabalho mimetizou a resposta inflamatória que ocorre em pacientes no ambiente pulmonar:
  - Intenso infiltrado celular;
  - Formação de edema pulmonar;
  - Elevação dos níveis de IL-6 e KC;
  - Diminuição da função pulmonar;
    - Do ponto de vista sistêmico:
      - Aumento de células polimorfonucleares no sangue;
      - Presença de bactéria no sangue e fígado do animais;
      - Aumento de IL-6 e TNF- $\alpha$  no plasma;
- A pneumonia grave foi capaz de induzir neuroinflamação, com ativação de microglia; aumento de IL-6, MCP-1, IL1- $\beta$  e TGF- $\beta$  e presença de estresse oxidativo no tecido cerebral;
- A pneumonia grave foi capaz de induzir um dano cognitivo que parece ser irreversível, diferentemente do modelo de CLP onde houve recuperação do dano cognitivo observado;
- O padrão morfológico da microglia se mostrou inalterado à longo prazo tanto no modelo de CLP quanto no modelo de pneumonia;
- A quantificação de neurônios no giro denteado permaneceu inalterada no modelo de pneumonia quando observada à longo prazo;
- A pneumonia grave foi capaz de promover alterações sinápticas agudas que persistiram à longo prazo, podendo este ser um dos mecanismos responsáveis pelo comprometimento cognitivo observado neste modelo;

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Andersson P.B., Perry V.H., Gordon S. The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues. *Neuroscience*. 1992; 48(1):169–186. (a)

Andersson PB, Perry VH, Gordon S. Intracerebral injection of proinflammatory cytokines or leukocyte chemotaxins induces minimal myelomonocytic cell recruitment to the parenchyma of the central nervous system. *J Exp Med*. 1992;176:255–259. (b)

Agrawal A., Zhuo H., Brady S., Levitt J., Steingrub J., Siegel M.D., et al. Pathogenetic and predictive value of biomarkers in patients with ALI and lower severity of illness: results from two clinical trials. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012; 303(8):L634-9.

Agustí C., Rañó A., Rovira M., Filella X., Benito N., Moreno A., Torres A. Inflammatory response associated with pulmonary complications in non-HIV immunocompromised patients. *Thorax*. 2004; 59:1081–1088.

American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171:338-416.

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*. Baltim. 2001; 29(7):1303–1310.

Arancibia F., Bauer T.T., Ewig S., Mensa J., Gonzalez J., Niederman M.S., Torres A. Community-acquired pneumonia due to gram-negative bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*: incidence, risk, and prognosis. *Arch Intern Med*. 2002; 162:1849–1858.

Bacci M.R., Leme R.C., Zing N.P., Murad N., Adami F., Hinnig P.F., Feder D., Chagas A.C.P. and Fonseca F.L.A. IL-6 and TNF-alpha serum levels are associated



with early death in community-acquired pneumonia patients. *Braz J Med Biol Re.* 2015; 48:427–32.

Bakirci S, Kafa IM, Uysal M, Ayberk Kurt M. Increased adult neurogenesis in the subventricular zone in a rat model of sepsis. *Neurosci Lett.* 2011; 497(1):27-31.

Balamayooran T, Balamayooran G, Jeyaseelan S. Review: Toll-like receptors and NOD-like receptors in pulmonary antibacterial immunity. *Innate Immun.* 2010; 16(3):201-10.

Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, Quevedo J, Dal Pizzol F. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* 2006; 34:886–889.

Barichello T, Machado RA, Constantino L, Valvassori SS, Reus GZ, Martins MR, Petronilho F, Ritter C, Quevedo J, Dal Pizzol F. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit Care Med.* 2007; 35:2186–2190.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal Pizzol F. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* 2005; 33:221–223.

Barkhausen T., Tschernig T., Rosenstiel P., van GM, Vonberg R.P., Dorsch M., et al. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit Care Med.* 2011; 39(6):1407–13.

Baune B.T., Wiede F., Braun A., Golledge J., Arolt V., Koerner H.. Cognitive dysfunction in mice deficient for TNF- and its receptors. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008; 147B:1056-64.

Bekinschtein, P., Katze, C. Slipczuk, L., Gonzalez, C., Dorman, G, Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J.H.. Persistence of Long-Term Memory Storage: New Insights into its Molecular Signatures in the Hippocampus and Related

Structures. *Neurotoxicity Research*. 2010; 18:377-385.

Bellaver B., Souza D. G., Bobermin L. D., Goncalves C. A., Souza D. O., Quincozes-Santos A.. Guanosine inhibits LPS-induced pro-inflammatory response and oxidative stress in hippocampal astrocytes through the heme oxygenase-1 pathway. *Purinergic Signal*. 2015; 11 571–580.

Bénardais K, Gudi V, Gai L, Neßler J, Singh V, Prajeeth CK, et al. Long-term impact of neonatal inflammation on demyelination and remyelination in the central nervous system: Neonatal Insult Impacts Microglia Functions. *Glia*. 2014; 62:1659–1670.

Benarroch E. E.. Circumventricular organs: receptive and homeostatic functions and clinical implications. *Neurology*. 2011; 77:1198–1204.

Berra L., Sampson J., Wiener-Kronish J. *Pseudomonas aeruginosa*: acute lung injury or ventilator-associated pneumonia?. *Minerva Anestesiologica*. 2010; 76(10):824-32.

Birkun A.A., Kubyshkin A.V., Novikov N.Y., Krivorutchenko Y.L., Fedosov M.I., Postnikova O.N., Snitser A.A.. Joint intratracheal surfactant-antibacterial therapy in experimental *Pseudomonas*-induced pneumonia. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2015; 28(4):299-307.

Bordon J, Wiemken T, Peyrani P, Paz ML, Gnoni M, Cabral P, et al. Decrease in long-term survival for hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Chest*. 2010; 138: 279–83.

Boven LA, Montagne L, Nottet HS, De Groot CJ. Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions. *Clin Exp Immunol*. 2000; 122:257–63.

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. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010; 30:440–448.

Bozza FA, D'Avila JC, 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.

Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Medicine.* 2000; 26(supplement 1):S64–S74.

Burm SM, Peferoen LA, Zuiderwijk-Sick EA, Haanstra KG, 't Hart BA, van der Valk P, Amor S, Bauer J, Bajramovic JJ. Expression of IL-1 $\beta$  in rhesus EAE and MS lesions is mainly induced in the CNS itself. *J Neuroinflammation.* 2016; 13 (1); 138.

Brazil: WHO statistical profile. Genebra. Atualizado em 2015. Disponível em: [http://who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/en/](http://who.int/gho/mortality_burden_disease/en/). Acessado em janeiro de 2016.

Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., et al.. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004; 303:1532–1535.

Buckwalter M, Wyss-Coray T: Modelling neuroinflammatory phenotypes in vivo. *J Neuroinflammation.* 2004, 1: 10-10.1186/1742-2094-1-10.

Byrnes AP, Wood MJ, Charlton HM. Role of T cells in inflammation caused by adenovirus vectors in the brain. *Gene Ther.* 1996; 3:644–651.

Chopra M, Mason E, Borrazzo J, Campbell H, Rudan I, Liu L, et al. Ending of preventable deaths from pneumonia and diarrhoea: an achievable goal. *Lancet.* 2013; 381:1499–506.

Cheng D., Hoogenraad C.C., Rush J. Ramm E., Achlager M.A., Duong D.M., Xu P., Wijayawardana S.R., Hanfelt J., Nakagawa T., Sheng M., Peng J. Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and

cerebellum. *Mol Cell Proteomics*. 2006; 5:1158–1170.

Chignard M, Balloy V. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279:L1083–L1090.

Colton, C. A., Chernyshev, O. N., Gilbert, D. L., and Vitek, M. P. (2000). Microglial contribution to oxidative stress in Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899, 292–307.

Colton C.A. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J. Neuroimmune Pharmacol*. 2009; 4:399–418.

Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Rezin GT, Scaini G, Daufenbach JF, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res*. 2011;36(2):304–311.

Cross, A.H., Keeling, R.M., Goorha, S., San, M., Rodi, C., Wyatt, P.S., Manning, P.T. Sz Misko, T.P. Inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity correlate with disease activity in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol*. 1996; 71, 145-153.

Cross A.H., Manning P.T., Stern M.K., Misko T.P. Evidence for the production of peroxynitrite in inflammatory CNS demyelination. *J Neuroimmunol*. 1997; 80:121–30.

Cusimano M, Biziato D, Brambilla E, Donega M, Alfaro-Cervello C, Snider S, Salani G, Pucci F, Comi G, Garcia-Verdugo JM, De Palma M, Martino G, Pluchino S. Transplanted neural stem/precursor cells instruct phagocytes and reduce secondary tissue damage in the injured spinal cord. *Brain*. 2012; 135:447–60.

d'Avila JC, Santiago AP, Amâncio RT, Galina A, Oliveira MF, Bozza FA. Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Crit Care Med*. 2008 Jun;36(6):1925-32.

Da Cunha, L.G., Ferreira, M.F. de Moraes, J.A. et al. ExoU'-induced redox imbalance and oxidative stress in airway epithelial cells during *Pseudomonas aeruginosa* pneumosepsis. *Med Microbiol Immunol*, 2015; 204:673.

Davydow DS, Hough CL, Levine DA et al. Functional disability, cognitive impairment, and depression after hospitalization for pneumonia. *Am J Med* . 2013; 126:615–24.

De Lima C. D. M., Calegari-Silva T. C., Pereira R. M. S., de Oliveira Lima Santos S. A., Lopes U. G., Plotkowski M. C. M., et al. ExoU activates NF- $\kappa$  B and increases IL-8/KC secretion during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *PLoS ONE*. 2012; 7:e41772.

Dietrich WD, Alonso O, Halley M. Early microvascular and neuronal consequences of traumatic brain injury: a light and electron microscopic study in rats. *J Neurotrauma*. 1994; 11(3):289–301.

Duvernoy P.Y. and Risold, H.M.. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev*. 2007; 56:119 – 147.

Eidelman LA, Putterman D, Putterman C, Sprung CL. The spectrum of septic encephalopathy. Definitions, etiologies, and mortalities. *JAMA*. 1996;275:470–3.

El Kebir D., József L., Pan W., Filep J. G. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. *Circulation Research*. 2008; 103(4):352–359.

El Solh A, Pineda L, Bouquin P, Mankowski C. Determinants of short and long term functional recovery after hospitalization for community-acquired pneumonia in the elderly: role of inflammatory markers. *BMC Geriatr*. 2006;6(12):1–10.

Evans G.J.O., Cousin M.A. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem. Soc. Trans*. 2005;33:1350–1353.

Falguera M., Carratalà J., Ruiz-Gonzalez A., et al. Risk factors and outcome of community-acquired pneumonia due to gram-negative bacilli. *Respirology*. 2009; 14(1):105-111

Ferrari CC, Depino AM, Prada F, Muraro N, Campbell S, Podhajcer O, Perry VH, Anthony DC, Pitossi FJ. Reversible demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain. *Am J Pathol*. 2004; 165:1827–1837.

Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community- acquired pneumonia. *N Engl J Med*. 1997; 336: 243-250.

Flierl M, Rittirsch D, Huber-Lang M, Stahel P. Pathophysiology of septic encephalopathy—an unsolved puzzle. *Critical Care*. 2010; 14(3):165.

Force A.D.T., Ranieri V.M., Rubenfeld G.D., Thompson, B.T., Ferguson, N.D., Caldwell E., Fan E., Camporota L., Slutsky A.S. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *Jama*. 2012; 307(23): 2526-2533.

Forrester JV, Xu H, Lambe T, Cornall R.. Immune Privilege or privileged immunity? *Mucosal Immunol* (2008) 1:372–81.10.1038/mi.2008.27.

Frei K. et al. Production of B cell stimulatory factor-2 and interferon gamma in the central nervous system during viral meningitis and encephalitis. Evaluation in a murine model infection and in patients. *J Exp Med*. 1988; 168:449–453.

Fujitani S., Sun H.Y., Yu V.L., Weingarten J.A. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. 2011; 139: 909–19.

Fukuyama, R. et al. The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. *Eur. Neurol*. 2001; 46:35-8.

Gattinoni L, Chiumello D, Carlesso E, Valenza F. Bench-to-bedside review: chest wall elastance in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Lond Engl*. 2004;8:350–5.

GBD 2013 DALYs and HALE Collaborators. Murray CJ, Barber RM, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: quantifying the epidemiological transition. *Lancet*. 2015; 386:2145–2191.

Ge L., Liu X., Chen R., Xu Y., Zuo Y.Y., Cooney R.N., Wang G.: Differential susceptibility of transgenic mice expressing human surfactant protein B genetic variants to *Pseudomonas aeruginosa* induced pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 469:171–175.

Giannoudis P.V., Harwood P.J., Loughenbury P., van G.M., Krettek C., Pape H.C. Correlation between IL-6 levels and the systemic inflammatory response score: can an IL-6 cutoff predict a SIRS state? *J Trauma*. 2008; 65(3):646–52.

Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., Nandi S., See P., Gokhan S., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010; 330: 841–845.

Glabinski AR, Bielecki B, Ransohoff RM. Chemokine upregulation follows cytokine expression in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol*. 2003; 58:81–88.

Griffin W.S., L.C. Stanley, C. Ling, et al. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989, 86:7611–7615.

Grommes J, Soehnlein O: Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med*. 2011; 17: 293–307.

Guo R. B., Sun P. L., Zhao A. P., Gu J., Ding X., Qi J., et al. . (2013). Chronic asthma results in cognitive dysfunction in immature mice. *Exp. Neurol.* 247, 209–217.

Guller S, LaChapelle L. The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-fetal interfaces. *Sem Reprod Endocrinol.* 1999; 17:39–44.

Hampel H, Haslinger A, Scheloske M, Padberg F, Fischer P, Unger J. et al. Pattern of interleukin-6 receptor complex immunoreactivity between cortical regions of rapid autopsy normal and Alzheimer's disease brain. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2005; 255:269–78.

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. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008; 295:H1712–H1719.

Han S., Mallampalli R.K. The role of surfactant in lung disease and host defense against pulmonary infections. *Annals of the American Thoracic Society.* 2015; 12(5):765-74.

Hao J, Liu R, Piao W, Zhou Q, Vollmer TL, Campagnolo DI, Xiang R, La Cava A, Van Kaer L, Shi FD. Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. *J Exp Med.* 2010; 207:1907–1921.

Harris MG, et al. Immune privilege of the CNS is not the consequence of limited antigen sampling. *Sci Rep.* 2014; 4:4422.

Head, J.R., Billingham, R.E.. Immune privilege in the testis. II. Evaluation of potential local factors. *Transplantation.* 1985; 40:269–275.

Hernandes MS, D'Avila JC, Trevelin SC, Reis PA, Kinjo ER, Lopes LR, et al. The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. *J Neuroinflammation.* 2014;11:36.



Hinojosa AE, Garcia-Bueno B, Leza JC, Madrigal JL: CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation. *J Neuroinflammation*. 2011, 8:77-10.1186/1742-2094-8-77.

Hoffmann A., Pfeil J., Alfonso J., Kurz F.T., Sahm F., Heiland S., et al. Experimental Cerebral Malaria Spreads along the Rostral Migratory Stream. *PLoS Pathog*. 2016; 12(3): e1005470.

Holter J.C., Ueland T., Jenum P.A., Muller F., Brunborg C., Froland S.S., et al. Risk Factors for Long-Term Mortality after Hospitalization for Community-Acquired Pneumonia: A 5-Year Prospective Follow-Up Study. *PLoS One*. 2016; 11: e0148741.

Hoogland I. C., Houbolt C., van Westerloo D. J., van Gool W. A., van de Beek D.. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J. Neuroinflammation*. 2015, 12:114.

Hopkins RO, Weaver LK, Collingridge D et al. Two-year cognitive, emotional, and quality-of-life outcomes in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171:340–7.

Huet O, Ramsey D, Miljavec S, Jenney A, Aubron C, Aprico A, Stefanovic N, Balkau B, Head GA, de Haan JB, Chin-Dusting JP. Ensuring animal welfare while meeting scientific aims using a murine pneumonia model of septic shock. *Shock*. 2013; 39:488–494.

Hryniewicz A., Bialuk I. Kaminski K.A., Winnicka M.M.. Impairment of recognition memory in interleikin-6 knock-out mice. *Eur J Pharmacol*. 2007; 577:219-20.

Iacobone E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens RD, Sharshar T. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Crit Care Med*. 2009; 37(10 Suppl):S331–6.

Imamura Y., Wang H., Matsumoto N., et al. Interleukin-1 $\beta$  causes long-term potentiation deficiency in a mouse model of septic encephalopathy. *Neuroscience*. 2011; 187:63–69.

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

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 (London)*. 1998; 393:635-636.

Izquierdo, I.; Medina, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*. 1997; 68(3):285-316.

Izquierdo, I.; Medina, J.H., Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A.; Barros, D.M.. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*. 1999; 103:1-11.

Johnstone J, Eurich DT, Majumdar SR, Jin Y, Marrie TJ. Long-term morbidity and mortality after hospitalization with community-acquired pneumonia: a population-based cohort study. *Medicine (Baltimore)* 2008;87(6):329–34.

Justicia C., Panes J., Sole S., Cervera A., Deulofeu R., Chamorro A., et al.. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2003; 23:1430–1440.

Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia*. 1998; 23(1):1–10.

Kang C.I., Song J.H., Oh W.S., Ko K.S., Chung D.R., Peck K.R. Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study group. Clinical outcomes and risk factors of community-acquired pneumonia caused by gram-negative bacilli. *Eur J*

Clin Microbiol Infect Dis. 2008; 27(8):657-661.

Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013;7:3.

Kaur C, Sivakumar V, Dheen ST, Ling EA. Insulin-like growth factor I and II expression and modulation in amoeboid microglial cells by lipopolysaccharide and retinoic acid. *Neuroscience*. 2006; 138:1233–1244.

Khandaker GM, Jones PB. Cognitive and functional impairment after severe sepsis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2011; 305(7):673-674.

Knaus W.A., Draper E.A., Wagner D.P., Zimmerman J.E.: APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985; 13: 818-829.

Kondo S., Kohsaka S., Okabe S. Long-term changes of spine dynamics and microglia after transient peripheral immune response triggered by LPS in vivo. *Mol Brain*. 2011; 4:27.

Kroner A, Greenhalgh AD, Zarruk JG, Passos Dos Santos R, Gaestel M, David S. TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron*. 2014; 83(5):1098–116.

Lawson L.J., Perry V.H., Dri P., Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult-mouse brain. *Neuroscience*. 1990; 39:151–170.

Leemans J.C., Vervoordeldonk M.J., Florquin S., Van Kessel K.P., Van Der Poll T. Differential role of interleukin-6 in lung inflammation induced by lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165:1445-1450.

Lemstra AW, Woud JCG, 't, Hoozemans JJ, van Haastert ES, Rozemuller AJ, Eikelenboom P, et al. Microglia activation in sepsis: a case–control study. *J Neuroinflammation*. 2007; 4:4.

Leszek J. E., Barreto G. E., Gasiorowski K., Koutsouraki E., Aliev G. Inflammatory mechanisms and oxidative stress as key factors responsible for progression of neurodegeneration: role of brain innate immune system. *CNS Neurol. Dis. Drug Targets*. 2016; 15:329–336.

Lin Z, Pearson C, Chinchilli V, Pietschmann SM, Luo J, et al. Polymorphisms of human SP-A, SP-B, and SP-D genes: association of SP-B Thr131Ile with ARDS. *Clin Genet*. 2000; 58: 181–191.

Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015; 523:337–41.

Lucas S.-M., Rothwell N. J., Gibson R. M. (2006). The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol.* 147, S232–S240.

Machado G.B., de Assis M.C., Leão R., Saliba A.M., Silva M.C., Suassuna J.H., de Oliveira A.V., Plotkowiski M.C. ExoU-induced vascular hyperpermeability and platelet activation in the course of experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumosepsis. *Shock*. 2010; 33: 315–321.

Machado GB, Oliveira AV, Saliba AM, Lima CDM, Suassuna JHR, et al. *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoU induces a PAF-dependent impairment of alveolar fibrin turnover secondary to enhanced activation of coagulation and increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in the course of mice pneumosepsis. 2011, *Respir Res*. 12:104.

Maier S. F. Bi-directional immune-brain communication: implications for understanding stress, pain, and cognition. *Brain Behav. Immun*. 2003; 17:69–85.

Malle E., Marsche G, Arnhold J, Davies MJ. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1761:392–415.

Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*. 2007; 44 Suppl 2:S27-72.

Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6:147–163.

Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006; 3:e442.

Matyszak M. K., Perry V. H. (1998). *Bacillus Calmette-Guerin* sequestered in the brain parenchyma escapes immune recognition. *J. Neuroimmunol*. 1998; 82:73–80.

Medawar, P. Immunity to homologous grafted skin III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol*, 1948; 29:58 -69.

Meyer U., Murray P.J., Urwyler A., Yee B.K., Schedlowski M., Feldon J. Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Mol Psychiatry*. 2008; 13(2):208-221.

McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci Lett*. 1987;79:195–200.

Mc Guinness, M.C., Powers, J. Bias, W.B., Schmeeckpaper, B.J., et al. Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of x-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 1997; 75(1-2):174-182.

Meares G. P., Ma X., Qin H., Benveniste E. N.. Regulation of CCL20 expression in astrocytes by IL-6 and IL-17. *Glia*. 2012; 60:771–781.

Michels M, Vieira AS, Vuolo F, Zapelini HG, Mendonça BP, Mina F, Dinguini D, Steckert AV, Schuck PF, Quevedo J, Petronilho F, Dal-Pizzol F. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2015; 43:54–59.

Michels M., Danielski L. G., Dal-Pizzol F., Petronilho F. Neuroinflammation: microglial activation during sepsis. *Current Neurovascular Research*. 2014; 11(3):263–270.

Mina F., Comim C. M., Dinguini D., et al.  $\text{IL-1}\beta$  involvement in cognitive impairment after sepsis. *Molecular Neurobiology*. 2014; 49(2):1069–1076.

Miyagishi R, Kikuchi S, Takayama C, Inoue Y, Tashiro K. Identification of cell types producing RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta in rat experimental autoimmune encephalomyelitis by in situ hybridization. *J. Neuroimmunol*. 1997; 77:17–26.

Moehle MS, West AB. M1 and M2 immune activation in Parkinson's disease: foe and ally? *Neuroscience*. 2014.

Mohammad M.G., Tsai V.W., Ruitenberg M.J., Hassanpour M., Li H., Hart P.H., et al. Immune cell trafficking from the brain maintains CNS immune tolerance. *The Journal of clinical investigation*. 2014; 124 (3):1228–41.

Moldoveanu B., Otmishi P., Jani P., Walker J., Sarmiento X., Guardiola J., Saad M.; Yu J. Inflammatory mechanisms in the lung. *J Inflamm Res*. 2009; 2: 1–11.

Monje M.L., Toda H., Palmer T.D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 2003; 302:1760-1765.

Moon LD, Fawcett JW: Reduction in CNS scar formation without concomitant increase in axon regeneration following treatment of adult rat brain with a combination of antibodies to TGFbeta1 and beta2. *Eur J Neurosci*. 2001, 14: 1667-1677.

Moraes CA, Santos G, Spohr TCL de SE, D'Avila JC, Lima FRS, Benjamim CF, et al. Activated Microglia-Induced Deficits in Excitatory Synapses Through IL-1 $\beta$ : Implications for Cognitive Impairment in Sepsis. *Mol Neurobiol*. 2014; 52(1):653-63.

Morandi A, Rogers BP, Gunther ML et al. The relationship between delirium duration, White matter integrity, and cognitive impairment in intensive care unit survivors as determined by diffusion tensor imaging: the VISIONS prospective cohort magnetic resonance imaging study\*. *Crit Care Med* 2012;40:2182–9.

Murphy JB, Sturm E.. Conditions determining the transplantability of tissues in the brain. *J Exp Med*. 1923; 38(2):183–97.

Murray C. J. L., Acharya A. K. Understanding DALYs. *Journal of Health Economics*. 1997; 16(6):703–30.

Nguyen MD, D'Aigle T, Gowing G, Julien JP, Rivest S. Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*. 2004; 24:1340–1349.

Niederhorn JY. The induction of anterior chamber-associated immune deviation. *Chem Immunol Allergy*. 2007; 92:27–35.

Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science*. 2005; 308:1314–1318.

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. 2011; 333: 1456–1458.

Park C., Lee S., Cho I. H., Lee H. K., Kim D., Choi S. Y., et al. TLR3-mediated signal induces proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in astrocytes: differential signaling mechanisms of TLR3-induced IP-10 and IL-8 gene expression. *Glia*. 2006; 53:248–256.

Peng G, Feng Z, He FP, Chen ZQ, Liu XY, Liu P, et al. Correlation of hippocampal volume and cognitive performances in patients with either mild cognitive impairment or Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther.* 2015; 21:15–22.

Perl T.M., Dvorak L., Hwang T., Wenzel R.P. Long-term survival and function after suspected Gram-negative sepsis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 1995; 274(4):338–45.

Plotkowski M.C., Estado V., Santos S.A., da Silva M.C., Miranda A.S., de Miranda P.E., Pinho V., Tibiriça E., Morandi V., Teixeira M.M., Vianna A., Saliba A.M. Contribution of the platelet activating factor signaling pathway to cerebral microcirculatory dysfunction during experimental sepsis by ExoU producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathog Dis.* 2015;73(7).

Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J.. The role of chemokines in inflammation. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 1996; 26:211–223.

Quan N, Banks WA. Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun.* 2007; 21:727–35.

Quasney M.W., Waterer G.W., Dahmer M.K., Kron G.K., Zhang Q., Kessler L.A., Wunderink R.G. Association between surfactant protein Bp 1580 polymorphism and the risk of respiratory failure in adults with community acquired pneumonia. *Crit. Care Med.* 2004; 32 1115e1119.

Qin L., Wu X., Block M. L., Liu Y., Breese G. R., Hong J. S., et al. . (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia.* 2007; 55:453–462.

Ransohoff RM, Hamilton TA, Tani M, et al. Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J.* 1993; 7:592–600.



Ransohoff RM, Liu L, Cardona AE. Chemokines and chemokine receptors: multipurpose players in neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol.* 2007; 82:187–204.

Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature.* 2010; 468:253–262.

Reimann HA. An acute infection of the respiratory tract with atypical pneumonia. *JAMA.* 1938; 111:2377-84.

Reis PA, Estado V, da Silva TI, d'Avila JC, Siqueira LD, Assis EF, et al. Statins decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1003099.

Reynolds JH, McDonald G, Alton H, Gordon SB. Pneumonia in the immunocompetent patient. *Br J Radiol.* 2010; 83(996):998-1009.

Ringheim GE, Szczepanik AM, Petko W, Burgher KL, Zhu SZ, Chao CC. Enhancement of beta-amyloid precursor protein transcription and expression by the soluble IL-6 receptor/IL-6 complex. *Mol Brain Res.* 1998; 55:35– 44.

Rosengarten B, Krekel D, Kuhnert S, Schulz R. Early neurovascular uncoupling in the brain during community acquired pneumonia. *Critical Care.* 2012;16(2):R64.

Ross F.M., Allan S.M., Rothwell N.J., Verkhratsky A.. A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. *J Neuroimmunol.* 2003; 144:61-7.

Rothenhäusler H. B., Ehrentraut S., Stoll C., Schelling G., Kapfhammer H. P. The relationship between cognitive performance and employment and health status in long-term survivors of the acute respiratory distress syndrome: results of an exploratory study. *General Hospital Psychiatry.* 2001; 23(2):90–96.

Rothstein J. D., Dykes-Hoberg M., Pardo C. A., et al. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron.* 1996; 16(3):675–686.

Satoh T, Nakamura S, Taga T, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, et al. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol Cell Biol.* 1988; 8:3546–9.

Saunders N. R., Dreifuss J.-J., Dziegielewska K. M., Johansson P. A., Habgood M. D., Møllgård K., et al. . The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Front. Neurosci.* 2014; 8:404.

Schulert G.S., Feltman H., Rabin S.D., Martin, Battle S. E., Rello J., and Hauser A. R.. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *J. Infect. Dis.* 2003; 188:1695–1706.

Schwalm MT, Pasquali M, Miguel SP, Dos Santos JP, Vuolo F, Comim CM, et al. (2014). Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. *Mol Neurobiol*, 49(1):380-5.

Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, Heneka MT. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol.* 2005; 204:733–740.

Semmler A., Frisch C., Debeir T., Ramanathan M., Okulla T., Klockgether T., et al. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol.* 2007; 204:733-740.

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

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

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.

Sheng W.S., Hu S., Feng A., Rock R.B.. Reactive oxygen species from human astrocytes induced functional impairment and oxidative damage. *Neurochem Res.* 2013; 38:2148.

Shirai Y. On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogenous animals. *Jap Med World.* 1921; 1:14.

Shrum B., Anantha R.V., Xu S.X., Donnelly M., Haeryfar S.M., McCormick J.K., et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Res Notes.* 2014; 7: 233.

Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 141(2):471-501.

Sibila O, Laserna E, Maselli DJ, et al. Risk factors and antibiotic therapy in *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia. *Respirology* 2015; 20:660–666.

Singer BH, Newstead MW, Zeng X, Cooke CL, Thompson RC, Singer K, et al. (2016) Cecal Ligation and Puncture Results in Long-Term Central Nervous System Myeloid Inflammation. *PLoS ONE* 11(2): e0149136.

Singer M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama.* 2016; 315, 801–810.

Smith KJ, Lassmann H.. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet*

Neurology. 2002; 1:232–41.

Sprung CL, Peduzzi PN, Shatney CH, Schein RM, Wilson MF, Sheagren JN, Hinshaw LB. Impact of encephalopathy on mortality in the sepsis syndrome. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group. *Crit Care Med.* 1990; 18:801–806.

Stagi M., Dittrich P. S., Frank N., Iliev A. I., Schwille P., Neumann H. (2005). Breakdown of axonal synaptic vesicle precursor transport by microglial nitric oxide. *J. Neurosci.* 25, 352–362.

Stamatovic SM, Shaku P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV: Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005, 25 (5): 593-606.

Steckert AV, Comim CM, Mina F, Mendonça BP, Dominguni D, Ferreira GK, Carvalho-Silva M, Vieira JS, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Late brain alterations in sepsis-survivor rats. *Synapse.* 2013; 67(11):786–793.

Stevenson P. G., Hawke S., Sloan D. J., Bangham C. R.. The immunogenicity of intracerebral virus infection depends on anatomical site. *J. Virol.* 1997; 71:145–151.

Sun M, Gewirtz JC, Bofenkamp L, Wickham RJ, Ge H, O'Connor MB: Canonical TGF-beta signaling is required for the balance of excitatory/inhibitory transmission within the hippocampus and prepulse inhibition of acoustic startle. *J Neurosci.* 2010, 30: 6025-6035.

The United Nations Children's Fund (UNICEF)/World Health Organization (WHO). Pneumonia: The forgotten Killer of children. 2006. ([http://www.unicef.org/publications/index\\_35626.html](http://www.unicef.org/publications/index_35626.html)). (Acessado em 30 de janeiro de 2016).

Tang Y, Le W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol.* 2015; 20.

Tesseur I, Zou K, Esposito L, Bard F, Berber E, Can JV, Lin AH, Crews L, Tremblay P, Mathews P, et al: Deficiency in neuronal TGF-beta signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. *J Clin Invest.* 2006, 116: 3060-3069.

Thompson WL, Karpus WJ, Van Eldik LJ: MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. *J Neuroinflammation.* 2008, 5: 35-10.

Terrando N, Rei Fidalgo A, Vizcaychipi M, Cibelli M, Ma D, Monaco C, et al. The impact of IL1 modulation on the development of lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction. *Crit Care.* 2010; 14: R88.

Torres A, Rello J. Update in community-acquired and nosocomial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009, 15; 181(8):782-7.

Unsicker K, Flanders KC, Cissel DS, Lafyatis R, Sporn MB: Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience.* 1991, 44: 613-625.

Vardakas KZ, Matthaiou DK, Falagas ME. Incidence, characteristics and outcomes of patients with severe community acquired-MRSA pneumonia. *Eur Respir J.* 2009; 34(5):1148-58.

Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol.* 2005; 57(1):67–81.

Vincent J, De Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter P, Sprung C. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. *Crit Care Med.* 2000; 26:1793–1800.

Von Baum H, Welte T, Marre R, Suttorp N, Ewig S. Community-acquired

pneumonia through Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*: Diagnosis, incidence and predictors. *Eur Respir J.* 2010; 35(3):598-605.

Walker CL, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet.* 2013; 381:1405–1416.

Wang L, Cheng BF, Yang HJ, Wang M, Feng ZW. NF- $\kappa$ B protects human neuroblastoma cells from nitric oxide-induced apoptosis through upregulating biglycan. *Am J Trans Res.* 2015; 7(9):1541-52.

Weberpals M, Hermes M, Hermann S, Kummer MP, Terwel D, Semmler A, Berger M, Schafers M, Heneka MT. NOS2 gene deficiency protects from sepsis-induced long-term cognitive deficits. *J Neurosci.* 2009;3:14177–14184.

Whitsett J.A., Weaver T.E.. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347; 2141-2148.

Wierzba-Bobrowicz T, Lewandowska E, Lechowicz W, Stepień T, Pasennik E. Quantitative analysis of activated microglia, ramified and damage of processes in the frontal and temporal lobes of chronic schizophrenics. *Folia neuropathologica/Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences.* 2005; 43(2):81–89.

Wilcox ME, Brummel NE, Archer K, Ely EW, Jackson JC, Hopkins RO. Cognitive dysfunction in ICU patients: risk factors, predictors, and rehabilitation interventions. *Crit Care Med.* 2013 Sep;41(9 Suppl 1):S81-98.

Wohleb E. S., Godbout J. P.. Basic aspects of the immunology of neuroinflammation. *Mod. Trends Pharmacopsychiatry.* 2013; 28, 1–19.

Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Engelhardt B. Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol.* 2005; 109(2):181–190.

Yasukawa K., Hirano T., Watanabe Y., Muratani K., Matsuda T., Nakai S., Kishimoto T. (1987) Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J.* 1987; 6:2939–2945.

Yokoo H, Chiba S, Tomita K, et al. Neurodegenerative Evidence in Mice Brains with Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis: Preventive Effect of the Free Radical Scavenger Edaravone. Alves-Filho JC, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(12):e51539.

Young GB, Bolton CF, Archibald YM, Austin TW, Wells GA. The electroencephalogram in sepsis-associated encephalopathy. *J Clin Neurophysiol.* 1992; 9:145–152.

Zhang Z. Biomarkers, diagnosis and management of sepsis-induced acute kidney injury: a narrative review. *Heart, Lung and Vessels.* 2015; 7(1):64-73.

Zhu C., Herrmann U.S., Falsig J., Abakumova I., Nuvolone M., Schwarz P., Frauenknecht K., Rushing E.J., Aguzzi A. A neuroprotective role for microglia in prion diseases. *J Exp Med.* 2016; 213 (6):1047-59.

