



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PEDRO MARTINS PEREIRA KURTZ

**ENCEFALOPATIA ASSOCIADA A SEPSE: FISIOPATOLOGIA NA SEPSE
EXPERIMENTAL COM AVALIAÇÃO POR MONITORIZAÇÃO
MULTIMODAL e ESTUDO OBSERVACIONAL NA SEPSE CLÍNICA (ESTUDO
SAE)**

Rio de Janeiro

2016

PEDRO MARTINS PEREIRA KURTZ

**ENCEFALOPATIA ASSOCIADA A SEPSE: FISIOPATOLOGIA NA SEPSE
EXPERIMENTAL COM AVALIAÇÃO POR MONITORIZAÇÃO
MULTIMODAL e ESTUDO OBSERVACIONAL NA SEPSE CLÍNICA (ESTUDO
SAE)**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências. Orientadores Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza e do Prof. Dr. Luciano Cesar Pontes de Azevedo

Rio de Janeiro

2016

PEDRO MARTINS PEREIRA KURTZ

ENCEFALOPATIA ASSOCIADA A SEPSE: FISIOPATOLOGIA NA SEPSE

EXPERIMENTAL COM AVALIAÇÃO POR MONITORIZAÇÃO

MULTIMODAL e ESTUDO OBSERVACIONAL NA SEPSE CLÍNICA (ESTUDO

SAE)

Orientador: Dr. Fernando Augusto Bozza
Co-orientador: Dr. Luciano Azevedo
Aprovada em: ____/____/____

Tese apresentada ao curso de
Doutorado do Curso de Pós-
Graduação em Pesquisa Clínica
em Doenças Infecciosas do
Instituto Nacional de Infectologia
Evandro Chagas para obtenção
do grau de Doutor em Ciências.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol

Prof. Dr. Gabriel Rodriguez de Freitas

Prof. Jorge Ibrain Figueira Salluh

Prof. Dr. Joana da Costa Pinto D'Avila

Prof. Dr. Andre Miguel Japiassu

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Para Mia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao Dr. Fernando Bozza, meu amigo e orientador, pelo incentivo, pelo entusiasmo e pela confiança.

Agradeço ao Dr. Luciano Azevedo, meu coorientador, pelas noites de experimentos no laboratório e pelo exemplo.

Agradeço aos coautores deste trabalho, em especial a Dra. Cassia Righy, pela troca e pelas contribuições.

Agradeço também ao Dr. Fabio Miranda, pelo exemplo profissional e pelas oportunidades que me deu.

A minha família pela compreensão e apoio sempre.

A Elisa, pelo amor e parceria.

RESUMO

Introdução: A disfunção cerebral aguda é uma complicação importante da sepse. A fisiopatologia da disfunção cerebral na sepse ainda não é totalmente compreendida. Provavelmente envolve danos celulares, neuroinflamação, disfunção mitocondrial, fluxo sanguíneo cerebral e neurotransmissão / excitotoxicidade. Além disso, a disfunção cerebral aguda é um preditor de aumento da mortalidade e comprometimento cognitivo em pacientes com sepse internados na unidade de terapia intensiva (UTI). As alterações do eletroencefalograma (EEG) são comuns nos estágios agudos da sepse e correlacionam-se com a gravidade da disfunção orgânica sistêmica e neurológica. **Artigo 1:** Monitorização Multimodal Cerebral na Sepse: Estudo Experimental. Doze porcos machos e fêmeas, anestesiados, ventilados mecanicamente e monitorizados de forma invasiva foram alocados para um procedimento simulado (N = 5) ou indução de sepse (N = 7). Achados da microdiálise cerebral mostraram níveis inalterados da razão lactato / piruvato e glicose cerebral entre os grupos. As razões de glicose cerebral/sélica foram aumentadas nos animais sépticos durante o período do estudo, apesar de uma diminuição progressiva da glicose sélica. Além disso, os níveis de glutamina no microdialisado foram elevados a partir das 6 horas após a indução de sepse. A análise das amostras de tecido cerebral demonstrou que glutamato, glutamina, D-serina e L-serina estavam elevados no grupo com sepse, em comparação com o controle. No entanto, a dosagem de C-Fos, um marcador de neurotransmissão, permaneceu inalterado entre os grupos. **Conclusões:** Neste modelo de sepse ressuscitada, demonstramos alterações da bioenergética cerebral e atividade glutamatérgica, sem descompensação do metabolismo energético. **Artigo 2.** Disfunção Cerebral Aguda na Sepse: Alterações Eletroencefalográficas são Associadas a Delirium e Mortalidade. Este foi um estudo prospectivo, multicêntrico, observacional. EEG foi realizado em pacientes consecutivos internados na UTI por sepse grave ou choque séptico de infecção adquirida na comunidade, dentro de 72 horas após a admissão. Trinta e três pacientes foram submetidos a EEG na fase aguda de sepse. Houve alteração mais frequente no EEG, medida pelas escalas de Synek e Young, em pacientes que desenvolveram delirium, assim como entre os não sobreviventes. **Conclusões:** Neste estudo prospectivo de sepse grave ou choque séptico, EEG contínuo com padrão maligno

baseado no escore de Synek ou escore anormal de Young foi associado ao desenvolvimento de delirium ou delirium subsindrômico e mortalidade hospitalar.

ABSTRACT

Introduction: Acute brain dysfunction is a major complication of sepsis. The pathophysiology of brain dysfunction in sepsis remains unclear. It probably involves cellular damage, neuroinflammation, mitochondrial dysfunction, cerebral blood flow and neurotransmission/excitotoxicity. Moreover, acute brain dysfunction is a predictor of increased mortality and cognitive impairment in patients with sepsis admitted to the intensive care unit (ICU). Electroencephalogram (EEG) abnormalities are common in the acute stages of sepsis and correlate with the severity of systemic and brain dysfunction.

Artigo 1. Cerebral Multimodal Monitoring in Sepsis: An Experimental Study. Twelve anesthetized, mechanically ventilated and invasively monitored male and female pigs were allocated to a sham procedure (N = 5) or sepsis (N = 7). Cerebral microdialysis showed unchanged levels of lactate/pyruvate ratios and brain glucose between the groups. Brain/serum glucose ratios were increased in the septic animals during the study period despite a progressive decrease in serum glucose. Moreover, MD glutamine levels were elevated starting at 6 hours after sepsis. Tissue analysis showed elevated glutamate, glutamine, D-serine and L-serine in the sepsis group, as compared to sham. However, C-Fos, a marker of neurotransmission, was unchanged between groups.

Conclusions: In this model of resuscitated sepsis, neuroenergetics is altered, with exacerbated glutamatergic activity and increased glucose utilization by the brain, but no evidence of decompensate energy metabolism or excitotoxicity.

Artigo 2. Acute Brain Dysfunction in Sepsis: Electroencephalographic Changes are Associated with Delirium and Mortality. This was a prospective, multi center, observational study. Continuous EEG for 12 hours was performed in all consecutive patients acutely admitted in ICU for severe sepsis and septic shock from community-acquired infection, within 72 hours from admission. Thirty three patients underwent continuous in the acute phase of sepsis. Abnormal EEG findings, measured by Synek and Young scores, were more common in patients that developed delirium and among nonsurvivors.

Conclusions: In this prospective study of severe sepsis or septic shock, continuous EEG with a malignant pattern based on Synek's score or abnormal Young score was associated with development of delirium or subsyndromal delirium and hospital mortality.

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	13
1.1. Sepsis: Definições e Epidemiologia	14
1.2. Disfunção Cerebral Aguda associada a Sepsis	18
1.2.1. DCAS e Delirium: Epidemiologia e Impacto nos desfechos	18
1.2.2. Fisiopatologia	21
1.2.3. Diagnósticos e Monitorização	25
2. Justificativa	29
3. Objetivos	30
3.1. Objetivos gerais	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. Artigo 1	31
5. Artigo 2	59
6. Conclusões e Recomendações	83
7. Referências	85
Anexo 1 – CEUA Artigo 1	98
Anexo 2 – CEP Artigo 2	99
Anexo 3 – Termo de consentimento Artigo 1	100

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosine triphosphate

BHE – Barreira hemato encefálica

CAM-ICU – Confusion Assesment Method for Intensive Care Unit

DCAS – Disfunção Cerebral Associada a Sepse

EEG – Eletroencefalograma

FDG-PET - Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography

ICDSC – Intensive Care Delirium Screening Checklist

ICP – Intracranial pressure

LPR – Lactate Pyruvate ratio

LPS – Lipopolysaccharide

MD – Microdiálise Cerebral

NADPHOx – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase

NMDAR - N-methyl-D-aspartate receptor

PEEP – Positive End Expiratory Pressure

RM – Ressonância Magnética

SAE – Sepsis-Associated Encephalopathy

SDMO – Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos

SIRS – Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica

SOFA – Sequential Organ Failure Assessment

TC – Tomografia computadorizada

TLR – Toll-like Receptors

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

1 INTRODUÇÃO

Sepse pode ser definida como um conjunto de alterações do organismo deflagradas por uma resposta inflamatória desequilibrada, decorrente de uma infecção. Clinicamente a sepse se manifesta como disfunção de órgãos e sistemas vitais, potencialmente com alta morbidade e mortalidade.

Sepse é um problema de saúde pública mundial. Estima-se que, globalmente, mais de 20 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente. Os custos econômicos diretos ligados a sepse nos EUA variam entre US\$17 e 24 bilhões (Lagu et al. 2012), e soma-se a isto o impacto econômico indireto para a sociedade, mais difícil de se estimar. Este inclui dias perdidos de trabalho, ausência nas escolas e as sequelas de longo prazo. A incidência anual de sepse vem crescendo nas últimas décadas. Dados dos EUA a partir dos anos 2000 estimam entre 751.000 e 3.610.630 o número de novos casos por ano (Angus et al. 2001; Gaieski et al. 2013), com mortalidade variando entre 15 e 30%. No Brasil estima-se que cerca de 600.000 casos de sepse ocorram anualmente (Sales Júnior et al. 2006). Dados recentes demonstraram alta prevalência de sepse grave/choque séptico nas UTIs brasileiras (28%) (Brun-Buisson et al. 1995) com elevada taxa de mortalidade (55%).

Com o aumento progressivo da incidência mundial e a redução da taxa de mortalidade, surgem novos desafios na prevenção e manejo da sepse e de suas consequências de longo prazo. Pacientes que sobrevivem a sepse apresentam importante declínio cognitivo e perda de qualidade de vida. Um estudo recente estima que a sepse pode estar associada ao desenvolvimento de até 20.000 novos casos de comprometimento cognitivo moderado a grave nos EUA (Angus et al. 2001; Iwashyna et al. 2010). Esses efeitos de longo prazo podem estar associados a complicações na fase aguda (eg. Delirium e Encefalopatia associada a sepse) e a fatores de risco prévios dos pacientes.

1.1. Sepses – definições e epidemiologia

As definições de sepsis foram inicialmente estabelecidas em uma Conferência de Consenso da ACCP/SCCM em 1991 (Bone, Sibbald, and Sprung 1992). O termo Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) foi cunhado e passou a indicar um conjunto de manifestações clínicas secundárias a insultos inflamatórios diversos, inclusive infecção. Sepsis foi definida como um processo infeccioso conhecido, associado a sinais de SIRS. Terminologias como sepsis grave, choque séptico e Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO) começaram a ser usadas em estudos clínicos para estratificar a gravidade de sepsis (Rangel-Frausto et al. 1995; Brun-Buisson et al. 1995).

As novas definições de 1991 foram alvo de críticas, devido a sua alta sensibilidade, mas baixa especificidade. Os critérios de SIRS – temperatura corporal, leucocitose, frequência cardíaca e respiratória – não eram capazes de prever mortalidade em pacientes internados com febre.

Dez anos mais tarde, em 2001, novos critérios para definição e estratificação de sepsis foram discutidos. Critérios mais específicos foram propostos, incluindo a extensão da infecção (localizada ou sistêmica), a gravidade das disfunções orgânicas e os parâmetros de avaliação da resposta imune (proteína C reativa titulada - PCRt, procalcitonina, IL-6) (Levy et al. 2003). No entanto, estes novos critérios não chegaram a ser diretamente aplicados na prática clínica.

Mais recentemente, o *Sepsis Definitions Task Force* publicou novas definições de sepsis com base em análises retrospectivas de bancos de dados de grandes coortes de pacientes em hospitais dos EUA e Europa (Sepsis 3.0) (Singer et al. 2016). Sepsis foi definida como evidência de infecção associada a disfunção orgânica grave, caracterizada como uma mudança aguda de 2 ou mais pontos no escore SOFA (*Sequential-Organ Failure Assessment*). Os critérios clínicos para choque séptico também foram alterados, passando a incluir sepsis com hipotensão não responsiva a ressuscitação volêmica, lactato sérico maior que 2 mmol/L e necessidade de vasopressores para manter pressão arterial média acima de 65 mmHg. Uma das mudanças significativas nas novas definições foi a eliminação do uso dos critérios de SIRS (síndrome inflamatória de resposta sistêmica). Diversos estudos demonstraram que a presença de SIRS em pacientes hospitalizados é muito frequente e muitas

vezes está associada a condições benignas, sem relação com infecção. Esses critérios portanto não seriam apropriados e específicos para o diagnóstico de sepse. Além disso, foi incluído um escore simplificado de disfunção orgânica – Quick SOFA – que apresentou bom desempenho na identificação de alto risco de morte em pacientes com suspeita de infecção não admitidos na UTI. O qSOFA inclui taquipneia acima de 22 rpm, hipotensão sistólica menor que 100 mmHg e alteração da consciência. O uso do qSOFA apresentou boa capacidade preditiva de mortalidade hospitalar com área sob a curva ROC de 0.81 e desempenho superior ao uso dos critérios de SIRS. Outra mudança importante nas novas definições foi a inclusão do nível plasmático de lactato entre os critérios de choque séptico. Além de hipotensão refratária a fluidos e uso de vasopressores, o lactato deve estar acima de 2 mmol/L para configurar choque séptico.

Apesar das novas definições serem baseadas em análise de dados de uma extensa coorte de pacientes, sua aplicação na prática clínica tem sido controversa. As bases de dados utilizadas são majoritariamente compostas por pacientes norte-americanos e a análise foi feita retrospectivamente. Diferentes autores e instituições têm citado essas limitações para justificar a exigência de validação prospectiva dos novos critérios, especialmente em países de baixa e média renda, não representados nas bases de dados.

Aspectos epidemiológicos de sepse, incluindo fatores clínicos e microbiológicos, suas inter-relações e impacto na sobrevivência dos pacientes têm sido explorados por diversos autores utilizando as definições de 1992.

Os estudos sobre epidemiologia da sepse podem ser divididos em dois grandes grupos, os estudos retrospectivos e os prospectivos. Entre os retrospectivos estão incluídos os de Angus e Martin (Angus et al. 2001; Martin et al. 2003). Estes são grandes estudos populacionais baseados em bancos de dados de internações hospitalares e utilizam códigos de diagnóstico pós-alta (ex. ICD-9CM - *The International Classification of Diseases/WHO, 9th Revision, Clinical Modification*). Esses códigos são utilizados para pagamentos de internações e procedimentos hospitalares e não incluem características clínicas e fisiológicas presentes nas definições de sepse, levando a potencial imprecisão. Angus e colaboradores analisaram 6.621.559 internações hospitalares no ano de 1995 em 847 hospitais e identificaram 192.980 casos de sepse grave, estimando em 751.000 casos/ano nos EUA (300 casos por 100.000 habitantes ou 2,26 casos por 100 internações

hospitalares). Aproximadamente 51% destes pacientes receberam cuidados intensivos e a mortalidade hospitalar foi de em 28,6% (Angus et al. 2001). Outro estudo analisou dados de 750 milhões de internações hospitalares nos EUA entre 1979 e 2000, identificando mais de 10 milhões de casos de sepse e uma incidência crescente nestes 22 anos. Em 1979 a incidência era de 82,7 casos/100.000 habitantes e 240,4/100.000 em 2000 (Martin et al. 2003). A mortalidade teve declínio significativo, de 27,8% entre 1979 e 1984 para 17,9% entre 1995 e 2000. Um estudo mais recente comparou a aplicação das diferentes metodologias utilizadas nas análises epidemiológicas retrospectivas (Wang et al. 2007; Dombrovskiy et al. 2007) em uma nova coorte retrospectiva (Gaieski et al. 2013). Os achados mostram variação importante dependendo da metodologia usada. A incidência varia entre 300 a 1.000/100.000 pacientes e a mortalidade entre 14,7% e 29,9%. Apesar dos estudos serem retrospectivos, os achados auxiliam no dimensionamento do problema da sepse dentro do contexto da saúde pública.

Outro grande estudo observacional retrospectivo recente, desta vez conduzido na Austrália e Nova Zelândia, avaliou a mortalidade de pacientes com sepse grave e choque séptico entre 2000 e 2012. Mais de cem mil pacientes com sepse grave foram avaliados e a mortalidade mostrou redução de 35% para 18,4% em 12 anos, uma redução anual absoluta de 1,3% no período. A análise ajustada evidenciou ainda redução de 50% das chances de morte em 2012 em relação a 2000. Além disso, o estudo mostrou que pacientes não idosos e sem comorbidades tiveram mortalidade baixa – 5% (Kaukonen et al. 2014).

Entre os estudos prospectivos, embora com um número menor de pacientes incluídos, foram analisados dados mais detalhados e precisos sobre o diagnóstico de sepse, a gravidade do quadro e o desfecho dos pacientes. O primeiro grande estudo prospectivo observacional acompanhou 3.708 pacientes admitidos em um hospital universitário durante 9 meses (Rangel-Frausto et al. 1995). Sessenta e oito por cento preenchiam mais de dois critérios para SIRS e foram acompanhados por 28 dias. Durante o acompanhamento, 17% desenvolveram sepse, 13% sepse grave e 13% choque séptico. A mortalidade apresentou um aumento progressivo entre SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico: 7%, 16%, 20%, e 46%, respectivamente. Um estudo alemão estratificou o risco de desenvolver sepse grave a partir da presença dos sinais de SIRS. As chances de desenvolver sepse duplicaram a cada critério de SIRS presente (Engel et al. 2007). Outro estudo prospectivo e multicêntrico conduzido

na França avaliou incidência, fatores de risco e mortalidade de 1052 pacientes com sepse grave (Brun-Buisson et al. 1995). A incidência de sepse grave foi de 90/1.000 admissões na UTI e de choque séptico 69/1.000. A mortalidade em 28 dias em pacientes com sepse grave e choque séptico foi de 56% e 71%, respectivamente.

No Brasil, os dados epidemiológicos de sepse são recentes. O *Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES)* avaliou 1.383 pacientes internados em cinco unidades de terapia intensiva nas regiões sul e sudeste durante um período de cinco meses (Silva et al. 2004). Do total de 1.383 pacientes incluídos, 415 pacientes (30,5%) desenvolveram sepse, 241 (17,4%) sepse grave e 203 (14,7%) choque séptico. A taxa de mortalidade encontrada foi de 33,9%, 46,9% e 52,2%, para sepse, sepse grave e choque séptico, respectivamente. O estudo Sepse Brasil foi realizado em 75 UTIs de todas as regiões brasileiras (Sales Júnior et al. 2006). A incidência de sepse foi 16,7% (521 de 3128 pacientes admitidos em UTIs). Entre esses pacientes, sepse ocorreu em 19,6% dos casos, sepse grave em 29,6% e choque séptico em 50,8%. O tempo médio de internação na UTI foi de 15 dias. Diferenças regionais na mortalidade foram observadas, com taxas menores na região sudeste em relação as outras 4 regiões. A mortalidade global foi 46,6%, sendo 16,7% em pacientes com sepse, 34,4% com sepse grave e 65,3% com choque séptico. O estudo multicêntrico global PROGRESS (*Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis*) também oferece dados sobre características e prognóstico da sepse grave do Brasil, já que 982 dos 12.750 pacientes incluídos no estudo foram tratados em UTIs brasileiras. As características demográficas e a gravidade da sepse no Brasil foram similares as encontradas em outros países (Argentina, Canadá, Índia, Alemanha e Austrália), mas o tempo médio de internação no hospital foi mais longo (33 dias contra 28 dias no grupo global) e a mortalidade hospitalar mais elevada (67,4% no Brasil versus 49% no restante dos países) (Beale et al. 2009). Finalmente, um estudo recentemente analisou a prevalência e mortalidade de sepse grave no Brasil, incluindo 189 UTIs e 744 pacientes. Os dados apresentados e ainda não publicados demonstraram prevalência de sepse grave/choque séptico de 28,1% e mortalidade global de 54,5%. A avaliação conjunta dos dados epidemiológicos de sepse no Brasil sugere uma mortalidade elevada, acima de 50%.

A mortalidade de sepse está intimamente relacionada à presença de disfunções orgânicas. Entre estas, a disfunção cerebral é a mais prevalente, e será tratada com mais detalhe na próxima seção

1.2. Disfunção Cerebral Aguda Associada a Sepsis

A disfunção cerebral induzida por sepsis é também conhecida como encefalopatia associada a sepsis (do inglês: Sepsis-Associated Encephalopathy, SAE). Também podem ser encontrados os termos Delirium Associado a Sepsis ou Encefalopatia Séptica. Nesta tese utilizaremos o termo disfunção cerebral associada a sepsis (DCAS). Essa é uma complicação importante e frequente em casos graves de sepsis, chegando a afetar mais de 70% dos pacientes em alguns estudos. DCAS é caracterizada por alteração da consciência na fase aguda da sepsis e se associa a padrões eletroencefalográficos alterados. Além disso, apesar do resultado de exames de neuroimagem normalmente não apresentar alterações, a Ressonância Magnética (RM) do crânio na fase aguda pode apresentar isquemia cerebral e/ou hiperintensidades na substância branca (Polito et al. 2013). DCAS é considerada reversível, mas a recuperação pode durar um período prolongado e frequentemente ser incompleta. Pacientes com DCAS têm maior risco de desenvolver comprometimento cognitivo de longo prazo e essas consequências podem estar associadas a achados de atrofia cerebral evidenciados por exames de neuroimagem meses após o episódio agudo de sepsis grave (Gunther et al. 2012; Semmler et al. 2013).

1.2.1. Disfunção Cerebral Associada a Sepsis e Delirium: Epidemiologia e Impacto nos desfechos

A DCAS é uma alteração neurológica aguda da consciência, que inclui delirium e coma, e normalmente ocorre precocemente no curso da sepsis. A DCAS pode afetar mais de 2/3 dos pacientes com sepsis, e se caracteriza por confusão mental, delírio, perda de memória, déficit na atenção, depressão e coma (Iwashyna et al. 2010). Recentemente, vários estudos sugerem a associação entre DCAS e elevada morbidade e mortalidade em pacientes com sepsis grave (Young et al. 1992; Eidelman

et al. 1996; Sprung et al. 1990; Sharshar et al. 2004; Nguyen et al. 2006). Estima-se que pacientes que evoluem com DCAS tenham 49% de probabilidade a mais de morrer em comparação a indivíduos com sepse sem alteração neurológica (Sprung et al. 1990; Ely et al. 2004).

Os fatores que levam a maior mortalidade em pacientes com DCAS ainda não são totalmente compreendidos. Uma das hipóteses relaciona a presença de disfunção do tronco cerebral, responsável pela regulação de funções vitais e modulação da resposta imune, ao aumento de mortalidade (Carlson et al. 2007). Estudos observacionais identificaram a gravidade do coma, alterações eletroencefalográficas, isquemia cerebral e a abolição do reflexo de tosse (em pacientes sedados) como fatores associados a maior mortalidade (Ely et al. 2004; Azabou et al. 2015; Polito et al. 2013; Sharshar, Porcher, et al. 2011).

Nos últimos anos, uma redução significativa nas taxas de mortalidade de pacientes com sepse grave e choque séptico resultou em uma população crescente de sobreviventes (Kaukonen et al. 2014). Sobreviventes de sepse frequentemente evoluem com um declínio dramático na capacidade funcional e na qualidade de vida, que pode persistir por anos (Winters et al. 2010). Consequências cognitivas e neuropsicológicas de sepse contribuem diretamente para este cenário. Declínio cognitivo tem sido demonstrado em pacientes após internação na UTI por sepse (Iwashyna et al. 2010), afetando até 1/3 dos sobreviventes 1 ano após a internação.

Estudos clínicos demonstraram que pacientes que sobreviveram a sepse grave apresentaram comprometimento cognitivo de longo prazo, incluindo alterações na memória, atenção, concentração e/ou prejuízo global da função cognitivo, além de perda de qualidade de vida (Angus et al. 2001; Rothenhausler et al. 2001; Granja et al. 2004; Hopkins et al. 2004; Iwashyna et al. 2010). A intensidade do declínio cognitivo é comparável a da doença de Alzheimer leve a moderada ou ao traumatismo crânio-encefálico (Pandharipande et al. 2013). Comprometimento cognitivo de longo prazo tem sido observado tanto em pacientes jovens quanto em idosos. Os pacientes mais velhos, no entanto, especialmente com distúrbios neurológicos pré-existentes, parecem ser mais suscetíveis a um declínio rápido e permanente (Lemay et al. 2014). Sugerindo associação bidirecional, demência e déficit cognitivo prévios se mostraram fatores de risco para sepse e pneumonia, assim como determinantes de uma piora cognitiva pós sepse mais marcante (Shah et al. 2013). Embora o potencial de sequelas significativas seja preocupante, as estratégias para evitar o prejuízo

cognitivo ou promover uma efetiva recuperação funcional ainda são escassos.

Recentemente alguns estudos seminais foram publicados ressaltando a importância desse declínio cognitivo após a hospitalização na UTI, principalmente entre pacientes sépticos. Iwashyna e colaboradores estudaram o efeito da sepse sobre o declínio cognitivo em uma coorte de 27.000 idosos acompanhados por 8 anos. Após um episódio de sepse houve um aumento significativo na probabilidade de desenvolvimento de disfunção cognitiva, que persistiu ao longo dos 8 anos de acompanhamento. Além disso, o risco de comprometimento cognitivo moderado a grave aumentou em 3 vezes, de 6,1% para 16,7%. Extrapolando os achados, os autores estimaram que a sepse pode contribuir para 20.000 novos casos de comprometimento cognitivo moderado ou grave nos Estados Unidos a cada ano (Iwashyna et al. 2010). Outros autores também demonstraram que sobreviventes de sepse apresentavam déficits no aprendizado verbal e na memória, além de reduções significativas no volume do hipocampo esquerdo comparados com controles saudáveis em exames de Ressonância Magnética (RM) de crânio (Semmler et al. 2013).

Pandharipande e colaboradores relataram os achados de um grande estudo multicêntrico, prospectivo de coorte, que avaliou os resultados cognitivos de longo prazo em uma população mista de pacientes críticos. Os achados do estudo mostram que a doença crítica está associada a novos déficits cognitivos clinicamente relevantes, independentemente da idade, da presença de co-morbidades ou do diagnóstico de admissão. Além disso, a presença de disfunção cerebral aguda, diagnosticada como delirium, durante a hospitalização na UTI foi fortemente associada a maior comprometimento cognitivo global e disfunção executiva (Pandharipande et al. 2013).

O delirium, que tem se mostrado frequente em pacientes críticos, prolonga a hospitalização e está associado a maior mortalidade. Especialmente o delirium persistente, com duração de 2 ou mais dias, tem pior prognóstico e maior mortalidade atribuída em relação ao delirium rapidamente reversível em pacientes críticos (Patel et al. 2014). Em sobreviventes após internação na UTI, delirium na fase aguda foi também associado à disfunção cognitiva de longo prazo, incluindo demência e depressão (Wolters et al. 2014; Girard et al. 2010; Popp 2013). Diante da associação frequentemente descrita de sepse e delirium (Tsuruta and Oda 2016) o declínio cognitivo pós sepse parece estar intimamente relacionado à disfunção cerebral

aguda. No entanto, os mecanismos exatos que conectam esses processos patológicos não são ainda totalmente compreendidos.

Pacientes que sobrevivem a sepse têm uma trajetória de saúde diferente da população em geral, tanto antes quanto depois do episódio agudo da doença. No entanto, a potencial relação causal da sepse e da disfunção cerebral aguda com a disfunção cognitiva e mortalidade no longo prazo ainda não está clara. A compreensão exata dos processos clínicos e biológicos que levam à morbidade de longo prazo é essencial para o desenvolvimento de medidas preventivas e terapêuticas em pacientes com sepse.

1.2.2. Fisiopatologia

A fisiopatologia da disfunção cerebral associada a sepse ainda é mal compreendida. Vários mecanismos têm sido propostos e incluem disfunção mitocondrial e vascular, dano oxidativo, distúrbios de neurotransmissores, neuroinflamação e morte celular (Bozza et al. 2013). O fluxo sanguíneo cerebral, integridade da barreira hemato-encefálica e o conteúdo de água cerebral também podem ser afetados (Pierrakos et al. 2014; Hughes et al. 2016). Alterações sistêmicas parecem afetar os mecanismos de disfunção cerebral. Estas incluem hipoxemia, febre, hipotensão, distúrbios hidroeletrólíticos e efeitos de drogas (ex. sedativos). Além disso a resposta imune a sepse, especialmente a produção de mediadores inflamatórios, tem consistentemente se mostrado relacionada a estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e falência orgânica.

A disfunção da barreira hemato-encefálica é um processo bem descrito na sepse experimental e clínica (Davies 2002; Weiss et al. 2009; Piazza et al. 2009; Polito et al. 2013). A quebra da BHE se caracteriza por alterações nas *tight junctions* endoteliais e disfunção das unidades gliovasculares, permitindo a passagem de mediadores inflamatórios e neurotóxicos para o cérebro. Um dos efeitos descritos da quebra da BHE é edema citotóxico e vasogênico observados em RM, além da facilitação do dano neuronal (Bozza et al. 2010; Sharshar et al. 2007).

Além da passagem de mediadores inflamatórios através da BHE disfuncional, a resposta inflamatória sistêmica se propaga para o SNC por outras vias. Uma das

vias é neural, através da ativação do nervo vago aferente (Mravec 2010; Janig and Green 2014). Outra via é humoral, através dos órgãos circunventriculares e do plexo coroide, desprovidos de barreira hemato-encefálica e que expressam proteínas importantes no reconhecimento de patógenos e receptores para citocinas pró-inflamatórias. A ativação de TLRs presentes nos órgãos circunventriculares induz a produção e liberação de citocinas no sistema nervoso central (Tracey 2002; Czura and Tracey 2005). Além dessas vias clássicas, foi recentemente descrita a presença de um sistema linfático no cérebro. Os vasos linfáticos se localizam nos seios durais e transportam células imunológicas (Louveau et al. 2015). Essas vias de sinalização levam à ativação da microglia e à liberação de citocinas pró-inflamatórias no parênquima cerebral.

Esse processo inflamatório amplificado no SNC é denominado neuroinflamação e está associado à ativação de células da glia (microglia e astrócitos), à geração de mediadores inflamatórios locais, à produção de espécies reativas de oxigênio, à quebra da BHE e a dano celular (Bellaver, Souza, Bobermin, Goncalves, et al. 2015; Bellaver, Souza, Bobermin, Souza, et al. 2015; Benardais et al. 2014; Hoogland et al. 2015; Kreutzberg 1996; Lossinsky and Shivers 2004; Streit, Walter, and Pennell 1999).

Outro componente precoce e essencial na patogênese da SAE é a ativação da micróglia (van Gool, van de Beek, and Eikelenboom 2010). Esta é composta por uma população de fagócitos mononucleares envolvidos na resposta imune e atividade sináptica. A ativação da microglia, que pode ser mediada por lipopolisacarídeos (LPS) e citocinas, leva a secreção de mediadores excitotóxicos como glutamato e interleucinas. Os fenótipos desenvolvidos pela micróglia ativada podem ser pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios, com efeitos neurotóxicos ou neuroprotetores. Além disso, sua ativação pode levar ao aumento da demanda metabólica, resultando em desequilíbrio energético e disfunção mitocondrial (Mazeraud et al. 2016).

Como potencial consequência dos mecanismos descritos acima observou-se desequilíbrio bioenergético e disfunção mitocondrial no cérebro de roedores e em monócitos de pacientes sépticos (Comim et al. 2008). Essas alterações se caracterizaram pela perda de potencial de membrana mitocondrial, redução da utilização de oxigênio e da capacidade de síntese de ATP (d'Avila et al. 2008; Japiassu et al. 2011). Estudos mais recentes mostraram também que o aumento da captação de glicose pelo cérebro faz parte desta adaptação metabólica ao processo

inflamatório. Além disso, a expressão e atividade aumentadas da NADPHox parece contribuir de maneira significativa para dano oxidativo, neuroinflamação e consequente déficit cognitivo em animais sobreviventes de sepse (Hernandes et al. 2014).

A participação dos astrócitos nos mecanismos ligados a neuroinflamação, excitotoxicidade e quebra da BHE têm sido também estudados em modelos de DCAS. Astrócitos são células da glia que fornecem energia e dão suporte para a manutenção da homeostase neuronal. Em diversas áreas do cérebro os processos astrocitários estão intimamente opostos a fendas sinápticas, inclusive aquelas que utilizam glutamato como neurotransmissor. Evidências sugerem que os astrócitos têm papel regulador da atividade sináptica através da recaptção de glutamato na fenda e liberação de neurotransmissores. Além disso, em modelos de isquemia cerebral, a atividade dos receptores NMDA (NMDAR) e a liberação de D-serina pelos astrócitos também estão afetados, juntamente com níveis excitotóxicos de glutamato (Kirschner et al. 2009). Como a D-serina atua como co-agonista do NMDAR (junto com glutamato) sua produção e liberação potencialmente promovem neurotoxicidade e dano neuronal adicionais (Watanabe et al. 2016).

A excitotoxicidade mediada pelo glutamato pode ainda contribuir para apoptose neuronal na sepse através de falência metabólica e distúrbios iônicos intracelulares. Evidências adicionais da importância desse mecanismo de lesão envolve a reciclagem e liberação de ascorbato pelos astrócitos. O ascorbato atua como antioxidante e atenua os efeitos tóxicos da liberação excessiva de glutamato. Na sepse os processos astrocitários que aumentam a concentração de ascorbato estão inibidos (Wilson and Dragan 2005). Concentrações reduzidas de ascorbato no plasma e líquido sugerem uma maior vulnerabilidade do cérebro a excitotoxicidade mediada pelo glutamato.

A autorregulação, perfusão e microcirculação cerebrais também podem estar alteradas na DCAS. Os mecanismos de autorregulação são responsáveis por manter o fluxo sanguíneo apesar de variações na pressão de perfusão cerebral. No nível microcirculatório as unidades gliovasculares ajustam o fluxo sanguíneo regional à demanda energética local. Lesões isquêmicas, lacunares e extensas, são frequentes em pacientes com DCAS. Até um 1/4 desses pacientes apresentaram infartos cerebrais em estudos post-mortem (Sharshar et al. 2004). Alterações da autorregulação cerebral, sem evidência de prejuízo direto da perfusão, parecem estar presentes e preceder o desenvolvimento de DCAS (Schramm et al. 2012; Pfister et al.

2008; Taccone, Castanares-Zapatero, et al. 2010). Além disso, a presença de disfunção microcirculatória foi recentemente demonstrada em modelos experimentais de sepse (Taccone, Su, et al. 2010; Araujo et al. 2012; Reis et al. 2016). Potencialmente essas alterações microcirculatórias estão associadas a ativação endotelial e distúrbios da autorregulação vascular.

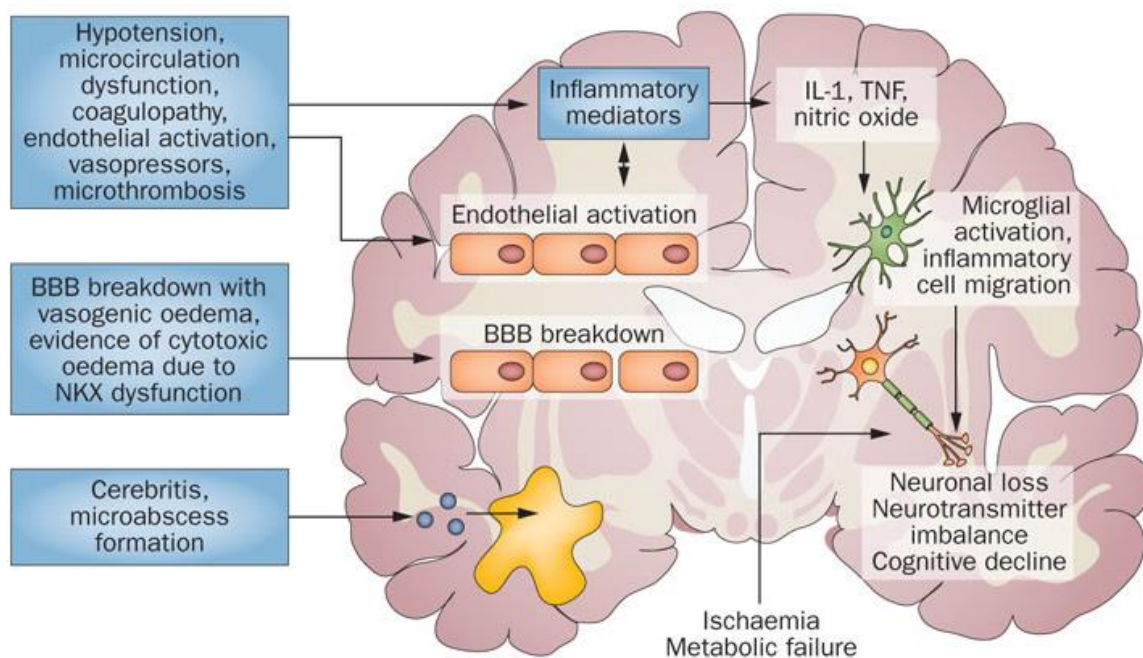


Figura 1. Mecanismos envolvidos na fisiopatologia da Disfunção Cerebral Associada a Sepse.

1.2.3. Diagnóstico e Monitorização

A DCAS se caracteriza clinicamente por flutuações agudas do nível de consciência, desorientação, déficit de atenção e/ou confusão mental (Iacobone et al. 2009). Agitação e alucinações também podem estar presentes. No espectro de alterações agudas do nível de consciência, pacientes mais graves apresentam-se não responsivos e evoluem em alguns casos com coma.

Algumas ferramentas clínicas estão disponíveis e validadas na UTI para o diagnóstico de delirium. O delirium compreende uma parte do espectro importante da disfunção cerebral aguda na sepse, mas é importante ressaltar que a DCAS não se limita ao diagnóstico de delirium. A *American College of Critical Care Medicine (ACCM)/Society of Critical Care Medicine* (Levy et al. 2003) publicaram em 2013 *guidelines* de dor, agitação e delirium que recomendam a monitorização rotineira de delirium na UTI. Entre as ferramentas validadas as recomendadas são a *Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit (CAM-ICU)* (Ely, Inouye, et al. 2001; Ely, Margolin, et al. 2001) e a *Intensive Care Delirium Screening Checklist (ICDSC)* (Bergeron et al. 2001). Diante do diagnóstico de disfunção cerebral aguda um exame neurológico mais minucioso e uma investigação diagnóstica mais detalhada deve ser realizada. Mais recentemente o delirium foi dividido em 2 categorias: (1) rapidamente reversível e associado à sedação e (2) delirium persistente (Patel et al. 2014). Esse estudo mostrou um aumento da mortalidade em pacientes com delirium persistente em relação àqueles sem delirium ou com delirium rapidamente reversível. Outra estratificação de gravidade do delirium que vem sendo estudada é o delirium sub-sindrômico. Quando o paciente apresenta ICDSC ou CAM-ICU alterado, mas sem critérios definitivos de delirium, configura-se delirium sub-sindrômico. Pacientes com esse espectro intermediário de delirium apresentam mortalidade aumentada em relação a pacientes sem alteração neurológica, mas inferior àqueles com critérios definitivos de delirium (Ouimet et al. 2007).

Ambas as escalas, CMA-ICU e ICDSC, apresentam limitações na sua aplicação em pacientes sedados. Apesar disso, estudos recentes sugerem que a avaliação da função do tronco cerebral é possível em pacientes profundamente sedados e que as alterações dos reflexos de tronco são preditoras de disfunção cerebral subsequente e de mortalidade (Sharshar, Porcher, et al. 2011).

Exames de neuroimagem devem ser considerados em pacientes selecionados com DCAS. Especialmente em pacientes com sepse que apresentam déficits focais, crises convulsivas e encefalopatia persistente, uma Tomografia Computadorizada (TC) ou RM do crânio é essencial. A TC de crânio pode auxiliar no diagnóstico diferencial, mas a RM permite maior sensibilidade na detecção de dano isquêmico lacunar ou lesões da substância branca. Sequências de RM como difusão e gradiente eco demonstram alta sensibilidade para detecção de pequenas lesões isquêmicas ou hemorrágicas, respectivamente. Padrões variados de alterações na RM, passando por edema citotóxico e vasogênico, encefalopatia posterior reversível (*PRES*), lesão da substância branca e atrofia cerebral, já foram descritos em pacientes e modelos experimentais de sepse (Sharshar et al. 2007; Bozza et al. 2010; Fugate et al. 2010; Bartynski et al. 2006; Morandi et al. 2012; Gunther et al. 2012; Semmler et al. 2013).

A monitorização multimodal cerebral tem sido cada vez mais usada na UTI para suporte e tratamento de pacientes neurocríticos. Uma abordagem integrada de dados fisiológicos à beira do leito, incluindo oxigenação cerebral, metabolismo, atividade elétrica e perfusão, permite uma melhor compreensão dos complexos mecanismos de lesão secundária e a individualização do tratamento. A oxigenação cerebral pode ser estimada através da mensuração local da pressão parcial de oxigênio na região subcortical do cérebro. O metabolismo cerebral pode ser avaliado através da microdialise cerebral (MD). Essa técnica consiste na inserção de um microtúbulo com uma membrana semi-permeável no tecido cerebral aproximadamente 2 cm abaixo da superfície. A MD permite a mensuração horária das concentrações de metabólitos no parênquima cerebral como lactato, piruvato, glicose, glutamato e glicerol. Uma relação lactato/piruvato elevada sugere um estado redox alterado do tecido que pode ser causado por disfunção mitocondrial ou hipóxia tissular. Variações da glicose usualmente refletem um desequilíbrio entre consumo e oferta de substratos no cérebro enquanto concentrações aumentadas de glutamato e glicerol se correlacionam com excitotoxicidade e dano neuronal, respectivamente. Não há estudos de monitorização multimodal invasiva em sepse clínica. Um estudo experimental recente em modelo animal de sepse demonstrou que choque séptico com hipotensão persistente leva à redução da oximetria tissular cerebral e ao aumento da produção de lactato. Esses achados sugerem uma associação entre alterações circulatórias e disfunção cerebral aguda (Taccone et al. 2014).

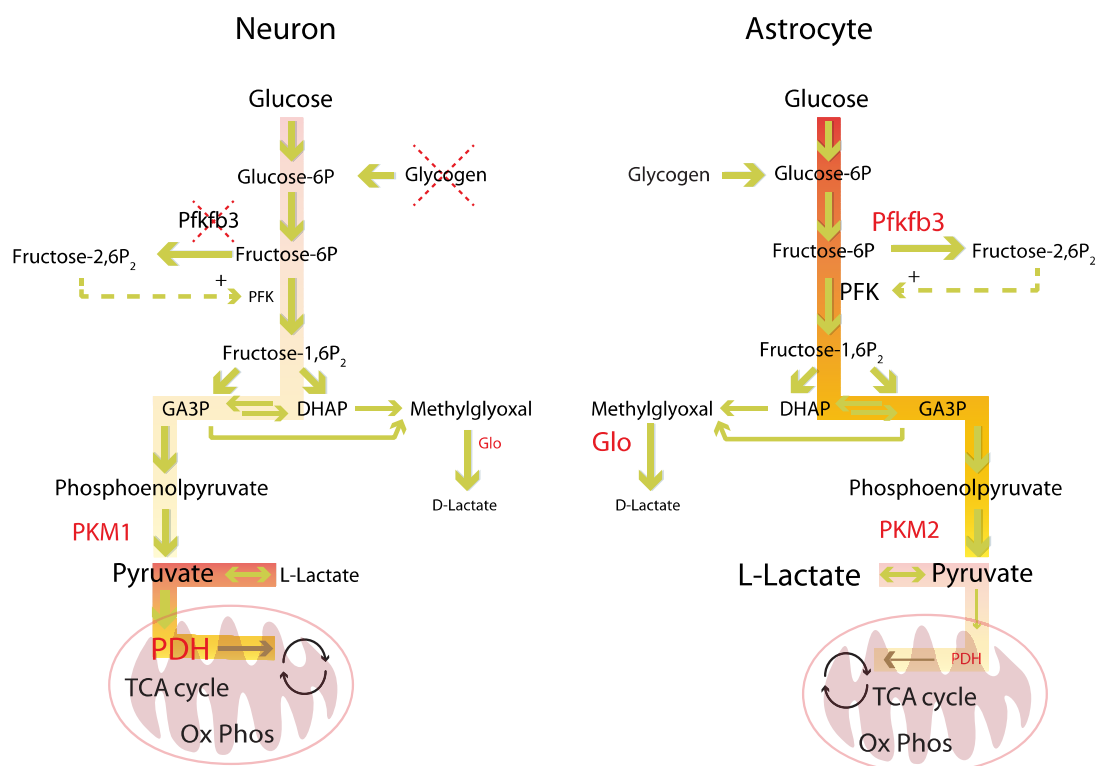


Figura 2. Metabolismo da glicose nos Astrócitos e Neurônios

O eletroencefalograma (EEG) está entre as técnicas utilizadas de monitorização multimodal. Por sua característica não invasiva, sua utilização em estudos clínicos de DCAS tem sido frequente. Diversos padrões eletroencefalográficos foram descritos em pacientes com sepse, inclusive status epilepticus não convulsivo (Oddo et al. 2009; Kurtz et al. 2014; Gilmore et al. 2015). Lentificação progressiva do ritmo de fundo (faixas teta e delta) com gravidades variadas, é a alteração mais comum no EEG. Atividade delta rítmica, descargas com morfologia trifásica e surto-supressão também já foram descritas (Synek 1988a, 1988b; Young et al. 1992). Sepse pode ainda estar associada a crises eletrográficas e descargas epileptiformes periódicas. Um estudo recente com 110 pacientes com sepse, com EEG realizado nos primeiros 3 dias de admissão na UTI, demonstrou que crises eletrográficas ocorreram em 15% dos pacientes e foram associadas à presença de delirium durante a monitorização. A lentificação grave do traçado, com predominância de atividade na faixa delta, também foi associada ao desenvolvimento subsequente de delirium (Azabou et al. 2015). Outro estudo recente utilizando EEG

contínuo encontrou uma forte associação entre descargas periódicas generalizadas e o desenvolvimento de crises não convulsivas em pacientes sépticos (Foreman et al. 2012). No entanto, achados conflitantes sobre a prevalência de crises eletrográficas e descargas periódicas, assim como o impacto dessas alterações no desfecho neurológico de pacientes com sepse, têm sido publicados. Em revisão sistemática recente, os autores encontraram entre os estudos prevalências conflitantes de alterações ictais no EEG de pacientes com sepse. Além disso, não houve dados suficientes para confirmar a associação entre a presença de crises eletrográficas e o aumento da mortalidade ou desfecho funcional após o episódio de sepse (Hosokawa et al. 2014).

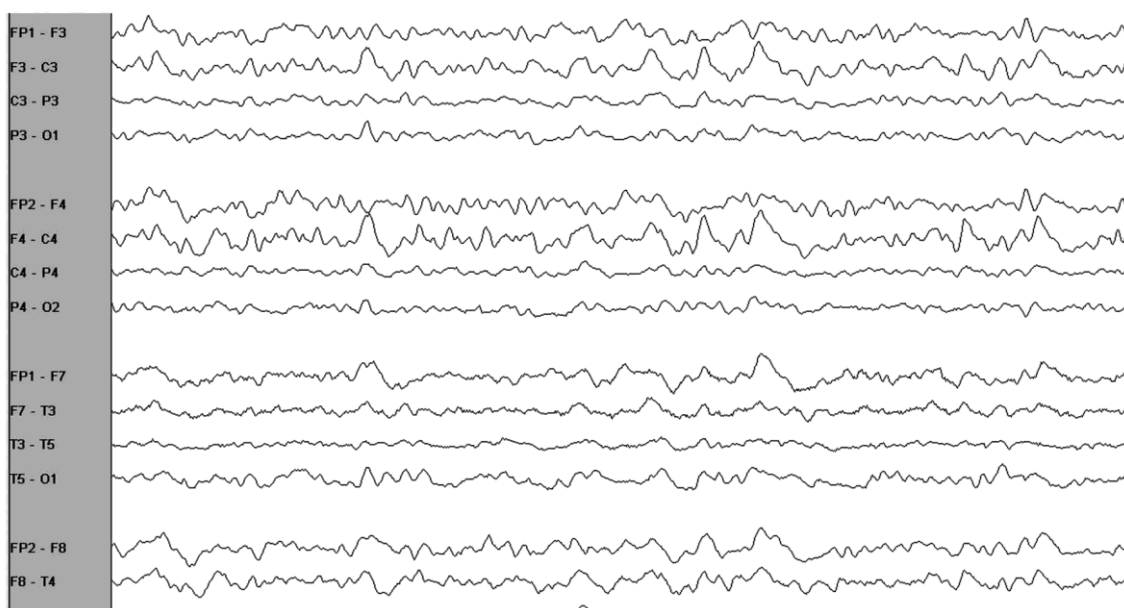


Figura 3. Eletroencefalograma com lentificação rítmica em paciente com encefalopatia associada a sepse

2 JUSTIFICATIVA

A disfunção cerebral aguda associada a sepse (DCAS) é a complicação mais prevalente da sepse grave. Sua fisiopatologia ainda não é totalmente compreendida e alguns métodos para diagnóstico não estão bem definidos. Além disso, não há tratamento específico disponível que mude a evolução da DCAS e seu impacto de longo prazo começou a ser avaliado apenas recentemente. Portanto, consideramos essencial estudar de forma experimental e clínica os seguintes aspectos relacionados a DCAS: 1) Avaliação do metabolismo cerebral e marcadores de neurotransmissão excitatória em um modelo experimental de sepse clinicamente relevante. Para isso utilizamos um modelo de peritonite em animais de grande porte, submetidos à monitorização multimodal cerebral com uso de cateter de pressão intracraniana e microdiálise. 2) Avaliação dos achados de eletroencefalografia contínua em um estudo observacional com pacientes na fase aguda de sepse grave ou choque séptico. Para isso os pacientes foram submetidos a 12 horas de EEG contínuo nas primeiras 72 horas de admissão por sepse e foram avaliados os desfechos de coma, delirium e mortalidade hospitalar.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar aspectos específicos da disfunção cerebral aguda associada a sepse, incluindo a fisiopatologia em um modelo experimental e o diagnóstico clínico em um estudo observacional em pacientes com sepse grave ou choque séptico.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Fase experimental

- a. Avaliar e documentar a evolução dos parâmetros de monitorização cerebral multimodal durante um modelo de sepse similar à doença clínica.
- b. Avaliar marcadores de metabolismo cerebral e neurotransmissão excitatória nesse mesmo modelo.

3.2.2. Fase clínica

- a. Definir a prevalência das alterações das alterações eletroencefalográficas na fase aguda da sepse e sua associação com desfecho
- b. Definir a prevalência, prognóstico e fatores associados à presença de disfunção cerebral aguda em pacientes com sepse admitidos na UTI.

4 ARTIGO 1:

Cerebral Multimodal Monitoring in Sepsis: An Experimental Study

Pedro Kurtz; Joana D'avila; Darwin Prado; Caroline Madeira; Charles Vargas-Lopes;
Rogerio Panizzutti; Luciano Azevedo; Fernando A. Bozza

Corresponding author:

Fernado A Bozza

Instituto Nacional de Infectologia, Fundação Oswaldo Cruz and Instituto D'Or de
Ensino e Pesquisa

Rio de Janeiro, Brazil

T + 55 21 99303 1551

bozza.fernando@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Acute brain dysfunction is a major complication of sepsis and its pathophysiology remains poorly understood. We studied the changes of brain metabolism and neurotransmission using cerebral multimodal monitoring in a clinically relevant resuscitated model of severe sepsis.

Methods: Twelve anesthetized, mechanically ventilated and invasively monitored male and female pigs were allocated to a sham procedure (N = 5) or sepsis (N = 7). Animals in the sepsis group were submitted to peritonitis fecal inoculation (0.5 g/kg). Fluid resuscitation was started during the surgical procedures and maintained during the study period to avoid shock. Animals were observed until spontaneous death or for a maximum of 24 hours. In addition to global hemodynamic and laboratory assessment, intracranial pressure and cerebral microdialysis (MD) were evaluated at baseline, 6, 12, 18 and 24 hours after sepsis induction. After euthanasia, the brain was rapidly removed, immediately frozen and a tissue fragment from the frontal cortex was analyzed for markers of neuroinflammation, metabolism and neurotransmission.

Results: Septic animals developed a hyperdynamic state associated with increased arterial lactate but none went into shock (mean arterial pressure < 65 mmHg). Cerebral microdialysis showed unchanged levels of lactate/pyruvate ratios and brain glucose between the groups. Brain/serum glucose ratios were increased in the septic animals during the study period despite a progressive decrease in serum glucose. Moreover, MD glutamine levels were elevated starting at 6 hours after sepsis. Tissue analysis showed elevated glutamate, glutamine, D-serine and L-serine in the sepsis group, as compared to sham. However, C-Fos, a marker of neurotransmission, was unchanged between groups.

Conclusions: In this model of resuscitated sepsis, neuroenergetics is altered, with exacerbated glutamatergic activity and increased glucose utilization by the brain, but no evidence of decompensate energy metabolism or excitotoxicity.

INTRODUCTION

Brain dysfunction is a major complication of sepsis, characterized by a spectrum of impaired consciousness, ranging from mild delirium to coma. It occurs early during sepsis and may be associated with brainstem dysfunction (1), electroencephalographic changes (2) and neuroimaging findings (3). Delirium has been shown to increase mortality (4) and acute brain dysfunction is related to long-term cognitive impairments (5).

The pathophysiology of brain dysfunction in sepsis remains unclear. It probably involves cellular damage, neuroinflammation, mitochondrial dysfunction, cerebral blood flow and neurotransmission/excitotoxicity (6). Neurotransmission and ionic homeostasis account for most of brain energy expenditure. Glutamate is the major excitatory amino acid, and its extracellular levels must be tightly regulated to maintain brain tissue homeostasis. Activated microglia in sepsis leads to secretion of cytokines and increased glutamate production, resulting in increased metabolic demand. Moreover, neurotransmitter reuptake, antioxidant defense and energy substrate delivery depend on a strong metabolic cooperation between astrocytes and neurons, and these processes critically depend on energy metabolism (7). Thus, neuroinflammation and increased excitatory glutamatergic neurotransmission may lead to a bioenergetic crisis and brain dysfunction. These processes have been suggested as potential therapeutic targets in sepsis-associated encephalopathy (8, 9).

Data on non-resuscitated animal models of septic shock have shown that neuroinflammation, altered brain energy metabolism and potentially ischemia are involved in the development of acute brain dysfunction and cognitive impairment (10-

12). However, these changes were associated with refractory hypotension and tissue hypoxia.

Multimodal monitoring with cerebral microdialysis allows for the evaluation of the extracellular neurochemical profile of the brain (13) after sepsis induction. Coupled with tissue analysis of metabolites related to energy metabolism and neurotransmission, there is opportunity to describe the potential mechanisms implicated in the development of acute brain dysfunction after sepsis.

The aim of this study was to evaluate the relationship of disturbances of brain metabolism and markers of excitatory neurotransmission with systemic and brain hemodynamics in a clinically relevant model of resuscitated sepsis. We hypothesized that brain metabolism and neurotransmission are impaired during sepsis and that these changes are unrelated to global hemodynamic changes.

MATERIALS AND METHODS

The study protocol was approved by the Institutional Animal Research Ethics Committee and was performed according to National Institute of Health guidelines for the use of experimental animals. Instrumentation, surgical preparation and induction of sepsis were performed as previously described (14).

Experimental animals, design and surgical preparation

Twelve male and female pigs weighing approximately 40 kg were fasted for 18 hours with free access to water prior to the experiment. Before the experiment, the animals were premedicated with intramuscular midazolam (0.3 mg/kg) and

acepromazine (0.5 mg/kg). The animals were then intubated and connected to mechanical ventilation (Evita XL, Dräger Medical, Lubeck, Germany) with a positive end expiratory pressure (PEEP) of 5 cmH₂O, oxygen inspiratory fraction (FIO₂) of 30%, tidal volume of 8 mL/kg and respiratory rate adjusted to maintain a pCO₂ level between 35 and 45 cmH₂O.

An introducer was placed through the external jugular vein using surgical dissection or ultrasound-guided insertion and a 7F pulmonary artery catheter (Edwards Lifesciences) was advanced into the pulmonary artery for continuous measurement of cardiac output, venous oxygen saturation and end-diastolic volume of the right ventricle. The right femoral artery and femoral vein were surgically exposed. A 6F arterial catheter was invasively introduced into the femoral artery and connected to a pressure transducer zeroed at the mid-chest level. A double-lumen catheter was inserted through the femoral vein for drug infusion.

The animals were monitored for heart rate, oxygen saturation, invasive arterial pressure and central venous pressure. All animals were sedated with continuous intravenous infusions of midazolam (0.3 mg/kg/h) and fentanyl (10 mcg/kg/h), and paralyzed with a bolus (0.15 mg/kg) and a continuous infusion of pancuronium (0.25 mg/kg/h).

A midline laparotomy (approximately 4 cm) was performed in all animals. A catheter was surgically inserted in the bladder to record urinary output throughout the experiment. After a 2 cm incision in the descendent colon, 1.5 g/kg body weight of feces was collected. The colon was then sutured and returned to the abdominal cavity. Two large plastic tubes were inserted into the peritoneal cavity through the abdominal wall, one in each side, for later injection of feces in the experimental group and saline

solution in the control group. The abdominal wall was then closed in two layers. After laparotomy the animals were placed in prone position.

After 60 minutes of stabilization the feces were mixed with 200 mL of saline solution at 37 degrees and infused in the 7 animals of the experimental group. The control group received 200 mL of warm saline solution. During the surgical procedure and injection of feces the animals received a continuous infusion of 1 mL/kg/min of crystalloids.

The moment before the injection of feces or saline was considered the baseline. Parameters recorded at baseline and hourly throughout the experiment included heart rate, cardiac output, arterial pressure, venous saturation, blood temperature, urinary output, peak and plateau airway pressures, PEEP, tidal volume, FiO₂, oxygen saturation and ICP. Arterial and mixed venous blood analysis were performed at baseline every 3 hours to measure glucose, arterial lactate, pH, pO₂, pCO₂, bicarbonate, bas excess, hemoglobin and hematocrit (ABL 700, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Body surface areas, cardiac index and cerebral perfusion pressure were calculated using standard formulas. At baseline and every 3 hours ICP, CPP and microdialysis parameters (lactate, glucose, pyruvate, glutamate, glycerol) were also recorded. After injection of feces all animals received a continuous intravenous infusion of 5 mL/kg of lactate ringer solution. Additional boluses of crystalloids (500 mL) were administered to keep mean arterial pressure (MAP) above 65 mmHg and mixed venous oxygen saturation above 65%. If the animal remained hypotensive despite volume loading, norepinephrine was initiated at a rate of 0.025 mcg/kg/min and titrated every 15 minutes to avoid hypotension. All animals were observed until spontaneous death or for a maximum of 24 hours after the induction of peritonitis.

After euthanasia of the animal, the brain was rapidly removed, immediately frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer -80°C until processing. A small fragment of frontal cortex was removed, weighed and diluted 10-fold in homogenization buffer contained 20mM Tris-HCl (pH 7.4), 2mM EDTA and a cocktail of protease inhibitors (Roche complete mini, Basel, Switzerland).

Cerebral microdialysis and tissue metabolite analysis

Before induction of sepsis, a crucial incision was made to open the scalp. Bilateral craniotomy was then performed in all animals using a drill to open two holes with a diameter of approximately 0.5 cm. The dura covering the frontal lobe on the right side of the cranium was visualized and opened in a small incision. A microdialysis catheter with a 10 mm membrane (CMA 70, CMA Microdialysis®, Stockholm, Sweden) was then inserted in order to keep all of the membrane extension inside the brain parenchyma. The dura mater on the left frontal lobe was visualized, punctured and an intraparenchymal fiberoptic catheter (Codman) was then inserted to measure intracranial pressure (ICP). Both catheters were placed under sterile conditions at a depth of 1 to 1.5 cm into the brain parenchyma. A CMA 106 microdialysis perfusion pump (CMA Microdialysis®) was used to perfuse the interior of the catheter with sterile artificial cerebrospinal fluid (Na⁺ 148 mmol/L, Ca²⁺ 1.2 mmol/L, Mg²⁺ 0.9 mmol/L, K⁺ 2.7 mmol/L, Cl⁻ 155 mmol/L) at a rate of 0.3 µl/min. Samples were collected every 3 hours into microvials, and immediately analyzed at the bedside for glucose, lactate, pyruvate, glutamate and glycerol (mmol/L) with the CMA 600 analyzer (CMA Microdialysis®). At least 1 hour passed between the insertion of the probe and the start of the sampling, to allow for normalization of changes due to probe insertion. The

analyzer was automatically calibrated on initiation using standard calibration solutions from the manufacturer. The remaining perfusate was frozen in a -70 degrees Celsius freezer for a posteriori analysis in the laboratory.

The homogenized tissues or microdialysis samples were treated to measure amino acids levels by high performance liquid chromatography as previously described (15, 16). Amino acid concentrations were expressed per gram of total proteins in tissue homogenates or micromolar concentration in microdialysis. Tissue fragments were homogenized at 4°C in RIPA buffer (Sigma, St. Louis, USA). Total protein concentrations were determined using the BCA assay (Pierce). Equal amounts of proteins (10 µg) were resolved in 4 –15% polyacrylamide gels and transferred to PVDF (polyvinylidene difluoride) membranes. Membranes were probed with primary antibodies, followed by the appropriate secondary antibody conjugated with infrared dyes (LI-COR Biosciences). Primary antibodies used were anti-c-fos (1:500; Abcam, Cambridge, MA) and anti-actin (1:10000; Abcam). Immunoreactive bands were visualized and quantified using Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). The relative levels of each protein were calculated as a ratio against actin, normalized to those of controls run in the same gel.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 23.0 (IBM Corp Armonk, NY) and GraphPad Prism, version 6.0 for Mac OS X (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Data are presented as mean \pm sd or median (IQR range). Normal distribution was confirmed using the Kolmogorov-Smirnov test. Variables were compared using parametric Student t tests or Mann-

Whitney U tests for nonparametric data. The significance of differences in the measured variables between groups was analyzed using a two-way (time and groups) analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post hoc analysis. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Twelve animals were used, 7 in the sepsis group and 5 sham. All but one animal survived for the 24 hours of the study period. This animal was on the sepsis group and presented sudden cardiac arrest after 12 hours of study. At baseline, there were no significant differences between groups in hemodynamic and respiratory variables (Table 1). In the sepsis group, heart rate, cardiac output and arterial lactate increased while serum glucose and base excess decreased during the study period in the sepsis group, as compared to sham animals. The mean arterial pressure decreased significantly from baseline in the septic animals. Although arterial lactate rose significantly in septic animals, none developed refractory hypotension or used noradrenaline during the study period. Septic animals received significantly more fluids as compared to sham, but both groups received large amounts of fluid resuscitation (total fluid intake 6725 ± 196 mL for sepsis and 5930 ± 258 for sham). A resuscitated model of severe sepsis was achieved in the septic group without overt hypotension.

Cerebral microdialysis showed unchanged lactate/pyruvate ratio in both groups (Figure 1, A and B). Brain glucose was similar between groups during the study period but the brain/serum glucose ratio was higher after 6 hours of sepsis and until the end of the study period in the sepsis group as compared to sham (Figure 1, C and D). Parameters of neurotransmission were also evaluated in the extracellular space by microdialysis. Extracellular glutamine was markedly elevated in the sepsis group while MD glutamate, D-serine and L-serine did not change during the study period or between groups (Figure 1, E, F, G and H). Thus, the extracellular profile of the brain during the study period indicated a preserved metabolic function with potentially increased glutamate-glutamin cycle, with efficiently controlled extracellular levels of glutamate.

The analysis of metabolites from the brain tissue demonstrated significant increase of glutamate, glutamin, D-serine and L-serine concentrations in the septic group (Figure 2). Together with findings of similar levels of c-Fos in the 2 groups, there is indication of the presence of exacerbated glutamatergic activity with unchanged excitatory neurotransmission (Figure 3).

DISCUSSION

The key finding of this study was that neuroenergetics is altered in a resuscitated model of sepsis, with exacerbated glutamatergic activity and increased glucose utilization by the brain, but no evidence of decompensate energy metabolism or excitotoxicity.

We used a clinically resembling model of sepsis aggressively resuscitated with fluids. This model has been shown to induce marked hemodynamic and systemic inflammatory alterations (17). Different than previous studies in large animal models of sepsis (11, 17, 18), our experimental protocol avoided shock during the study period. The objective was to investigate early changes in brain function in the absence of severe hypotension. With sepsis and fluid resuscitation, the systemic profile of septic animals confirmed a hyperdynamic state with tachycardia and increased cardiac output, however with a relative reduction of mean arterial pressure as compared to sham animals. Increased arterial lactate levels further reinforce the severity of sepsis induced. Septic animals received significantly more fluid resuscitation compared to controls. Fluid resuscitation started as early as the induction of sepsis in our protocol. Previous studies of brain dysfunction used more severe models of sepsis, with refractory hypotension and death before 24 hours of sepsis induction.

Cerebral multimodal monitoring with microdialysis and brain oxygenation has recently been studied in combination with microcirculation in animal models of sepsis (11, 18). Results showed that, although cortical microcirculatory impairment occurred earlier, brain metabolic distress (high LPR) and tissue hypoxia (low PbtO₂) developed mostly during shock. The authors suggested that refractory hypotension and, potentially, cerebral hypoperfusion, are critical factors in the development of anaerobic

metabolism in the septic brain (11). Acute brain dysfunction, however, develops early and independent of hypotension in patients with sepsis (4). Our results demonstrated that, in the absence of overt shock, brain energy metabolism appears to be compensated. Although extracellular LPR and glucose are similar in the 2 groups, the brain/serum glucose ratios differ. This finding indicates that compensatory mechanisms, such as increased glucose uptake, must be underway to maintain metabolic balance. FDG-PET data on brain glucose metabolism in sepsis show conflicting results. When PET was performed in a mice model of sepsis induced by LPS, glucose uptake was reduced in some areas of the brain and preserved in others (19). These findings were concomitant with neuroinflammation and reduced cerebral blood flow. However, the study findings are limited by the low severity of LPS-induced systemic changes of the septic animals. In contrast, more recent data show convincing evidence that glucose uptake is increased in the brain during sepsis. This is also in accordance with findings that suggest that glycolytic pathways are activated in neuroinflammation (20, 21). The increased uptake of glucose by the brain may explain similar brain glucose and LPR levels, found in septic animals in the presence of lower systemic glucose.

In addition to compensated parameters of brain metabolism, cerebral microdialysis showed unchanged levels of glutamate and elevated levels of glutamine starting after 6 hours of sepsis induction. In a similar model of sepsis, high extracellular glutamate only developed in animals with mean arterial pressure lower than 65 mmHg, suggesting ischemia as the main determinant (11). Glutamate is the major neurotransmitter of the brain comprising up to 80% of synaptic input to a given cortical region. Since synaptic signaling is the main site of energy utilization in the brain, accounting for 80% of the total cost, the glutamate-glutamine cycle is intimately related

to brain energy metabolism (22, 23). The glutamate-glutamine cycle comprises the transfer of glutamate from neurons to astrocytes and the corresponding return of glutamine from astrocytes to neurons (24). Glutamine synthetase converts glutamate, taken up from the synaptic cleft, to glutamine in an ATP-dependent process (25) undergone in the astrocyte (Figure 4). Our findings of increased extracellular glutamine with unchanged extracellular glutamate may be interpreted as an exacerbated glutamate-glutamine cycle, with preserved and tightly regulated mechanisms of glutamate uptake (8).

In line with the hypotheses that glutamatergic activity is exacerbated in septic animals, analyses of brain tissue homogenates showed elevated levels of glutamate, glutamine and D-serine. Glutamate production can result from uptake and recycle as well as be stimulated by neuroinflammation (7). D-serine is an amino acid synthesized mainly in astrocytes that is believed to act as a co-agonist of glutamate in the NMDA post-synaptic receptor (26, 27). Our concomitant findings of increased glutamatergic activity and higher D-serine levels in the tissue could indicate an exacerbated excitatory neurotransmission, and potentially excitotoxicity. However, c-Fos levels, a marker of neuronal activity (28), were unchanged in the brain tissue of septic and sham animals. One potential explanation of the presence of increased glutamatergic activity with unaltered neurotransmission would be a global synaptic deficit observed in experimental sepsis (29). This reduction is probably a consequence of microglia activation and production of IL-1B and may be an underlying mechanism related to acute brain dysfunction and cognitive impairment after sepsis.

Glutamate has an essential role in the neurometabolic coupling of the brain by acting on astrocytes. Although it has not been shown in sepsis, increased glutamatergic activity produces a shift of glucose utilization toward astrocytes (30) and

triggers aerobic glycolysis as a mean to produce energy and provide substrates, such as pyruvate and lactate, to neurons, where they are oxidized to produce ATP (7). Glutamate, however, is mainly converted to glutamine by glutamine synthase at the expense of 1 ATP. This glutamate-glutamine cycle allows a large proportion of glutamate to be recycled to neuronal terminals to replenish the glutamate vesicular pool (24, 31, 32). Thus, glutamate uptake and recycling put an energetic burden on astrocytes, resulting in a decrease in ATP content (33). This set of mechanisms, although highly efficient in normal circumstances, may lead to increased vulnerability in the context of sepsis due to a higher metabolic demand and energy requirements. In this setting, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and decreased ATP synthesis (10, 12) may lead to neuroenergetic failure and acute brain dysfunction (6).

Our findings, although preliminary, may have clinical implications. The compensated brain metabolism in our study, demonstrated by normal LPR and brain glucose in the absence of refractory hypotension, reinforces the potential role of brain perfusion in the development of acute brain dysfunction. Previous studies showed metabolic distress and brain tissue hypoxia during septic shock as pathophysiological markers of brain dysfunction. Combined with findings of microcirculatory impairment and altered cerebral autoregulation (34), it is likely that systemic hemodynamics have an impact on sepsis-associated brain dysfunction. Depending on autoregulatory status, individualized mean arterial pressure targets could prevent brain hypoperfusion and mitigate brain dysfunction (35).

Our study has some limitations. First, our protocol did not resemble the natural history of early sepsis since resuscitation started at induction of sepsis. However, this avoided the effects of hypotension on the brain, which was our objective. Second, we did not assess important parameters of brain function, such as EEG, tissue

oxygenation or regional blood flow. Thus, we cannot extrapolate the impact of our findings on these variables. Third, the surgical procedure and anesthesia induction may impact brain metabolism. However, we demonstrated convincing differences between the sepsis and sham group. Finally, our data are hard to be extrapolated to the human setting. Invasive cerebral multimodal monitoring is not feasible in clinical sepsis at the moment.

CONCLUSION

In a clinically relevant model of resuscitated sepsis, brain metabolism was preserved and glutamatergic activity was exacerbated without evidence of increased excitatory neurotransmission or excitotoxicity.

Tables and Figures

Table 1. Evolution of systemic hemodynamics, respiratory and biological variables over time in septic (n=7) and sham (n=5) animals

Parameter	Group	Baseline	6h	12h	18h	24h	ANOVA Within Group	ANOVA Sepsis vs Sham
Heart rate, beats/min	Sepsis	139±8.9	172±10	169±10	158±15	155±13	0.2	<0.001
	Sham	108±14	96±10	105±7	115±14	106±7	0.8	
Cardiac output, L/min	Sepsis	5.1±0.4	6.3±1.2	6.5±1.4	7.5±2.9	-	0.6	0.03
	Sham	4.9±0.6	4.8±0.6	4.7±0.5	4.6±0.9	4.8±0.5	0.9	
Temperature, °C	Sepsis	39.4±0.6	40.8±0.7	41.1±0.6	41.5±0.3	41.5±0.3	0.07	<0.001
	Sham	36.4±0.7	37.3±0.7	38.5±1	39.3±1.3	39.8±0.9	0.1	
Pulmonary artery occlusion pressure, mmHg	Sepsis	9±1.2	9.8±1.1	10±1	10±2	13±3	0.4	0.24
	Sham	11.2±1.4	12.6±2	11±1	10±2	12±1	0.8	
Mean arterial pressure, mmHg	Sepsis	114±4.3	93±4	89±3	84±5	76±4	<0.00	<0.001
	Sham	122±9.7	116±13	113±12	111±12	108±16	0.9	
Oxygen delivery, mL	Sepsis	709±57	1045±233	809±193	-	-	0.5	0.2
	Sham	655±113	599±134	585±91	535±171	619±97	0.9	
P/F ratio	Sepsis	350±20	350±19	352±22	335±29	-	0.9	0.8
	Sham	386±44	348±37	341±31	322±34	319±33	0.7	
pH	Sepsis	7.5±0.02	7.45±0.0	7.4±0.1	7.5±0.0	7.5±0.0	0.8	0.1
	Sham	7.5±0.05	7.5±0.0	7.5±0.0	7.5±0.0	7.5±0.0	0.9	
PaO ₂ , mmHg	Sepsis	127±6	122±8	125±6	120±9	126±16	0.9	0.2
	Sham	126±6	113±15	115±10	109±12	108±12	0.8	
Base excess	Sepsis	2.6±0.9	0.8±0.9	-3.8±4	1.2±0.3	-1±0.3	0.1	<0.001
	Sham	4.9±1	4.4±0.7	4.5±1.3	3.7±1.6	5.9±1	0.7	
Lactate, mg/dL	Sepsis	10.8±1.2	14.9±1.4	20±7	18±2	28±13	0.2	0.048
	Sham	11.8±1.7	14.8±2.8	15±2	13±8	12±4	0.8	

Hemoglobin, g/dL	Sepsis	10.5±0.4	12.8±0.8	11.2±0.5	11±1	9.2±0.1	0.06	0.02
	Sham	9.8±0.6	10.1±0.8	9.6±0.8	8.6±0.7	10.2±1.3	0.7	
Glucose, mg/dL	Sepsis	115±12	75±4	64±3	53±2	48±11	<0.00	<0.001
	Sham	130±22	120±6	107±6	94±8	90±5	0.9	
svcO ₂ , %	Sepsis	59±3	55±0.9	51±2	52±3	51±6	0.2	0.2
	Sham	71±3	55±13	61±5	56±5	-	0.4	
Plateau pressure, mmHg	Sepsis	17.4±2.6	17±2	18±1	19±2	23±3	0.4	0.9
	Sham	18±1.7	19±2	19±2	20±2	20±2	0.9	
CaO ₂	Sepsis	139±6	167±12	149±8	142±12	121±0.7	0.1	0.001
	Sham	130±8	119±14	121±10	106±10	123±12	0.6	
Fluid, cumulative, mL	Sepsis	1429±71	2886±91	4164±151	5375±174	6725±196	<0.00	<0.001
	Sham	1070±54	2250±45	3610±209	4770±231	5930±258	<0.00	
Urine output, cumulative, mL	Sepsis	0	471±72	685±123	1135±133	1467±124	<0.00	0.15
	Sham	0	704±199	1015±311	1281±332	1603±322	0.2	

Figure legends:

Figure 1. Cerebral microdialysis showing changes in extracellular pyruvate (A), lactate/pyruvate ratio (LPR, B), glucose (C), brain/serum glucose ratio (D), glutamate (E), glutamine (F), D-serine (G) and L-serine (H) in the septic (n=7, square) and sham (n=5, triangle) animals. Data are presented as mean±SD. Analysis of variance (ANOVA) for brain/serum glucose ratio: $P < 0.001$ and ANOVA for glutamine: $P < 0.001$. P value of less than 0.05 versus Sham is represented by * and P value of less than 0.001 is represented by **, with post hoc bonferroni correction. ANOVA was nonsignificant for cerebral pyruvate, LPR, glucose, glutamate, D-serine and L-serine.

Figure 2. Markers of excitatory neurotransmission in the frontal cortex of animals with sepsis. Brain tissue was obtained after 24 hours of sepsis onset or after death. Effects of sepsis induction on Glutamate (A), Glutamine (C), D-serine (B), L-serine (D) and the relationships Glutamate/Glutamine (E) and D-serine/L-serine. The statistical significance is expressed as: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$; n=7 (Sepsis) and n=5 (Sham).

Figure 3. Markers of excitotoxicity. Immunodetection (Western Blotting) for c-Fos (and actin) in brain tissue of the frontal cortex of the animals.

Figure 4. Summary of the main findings. This figure highlights the involvement of Glutamate and D-serine as co-agonists of the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAr) in the process of excitotoxicity related to sepsis-associated encephalopathy.

Glutamate, D-serine and Glutamine concentrations are increased in the brain tissue of septic animals suggesting increased glutamatergic activity.

Figure 1.

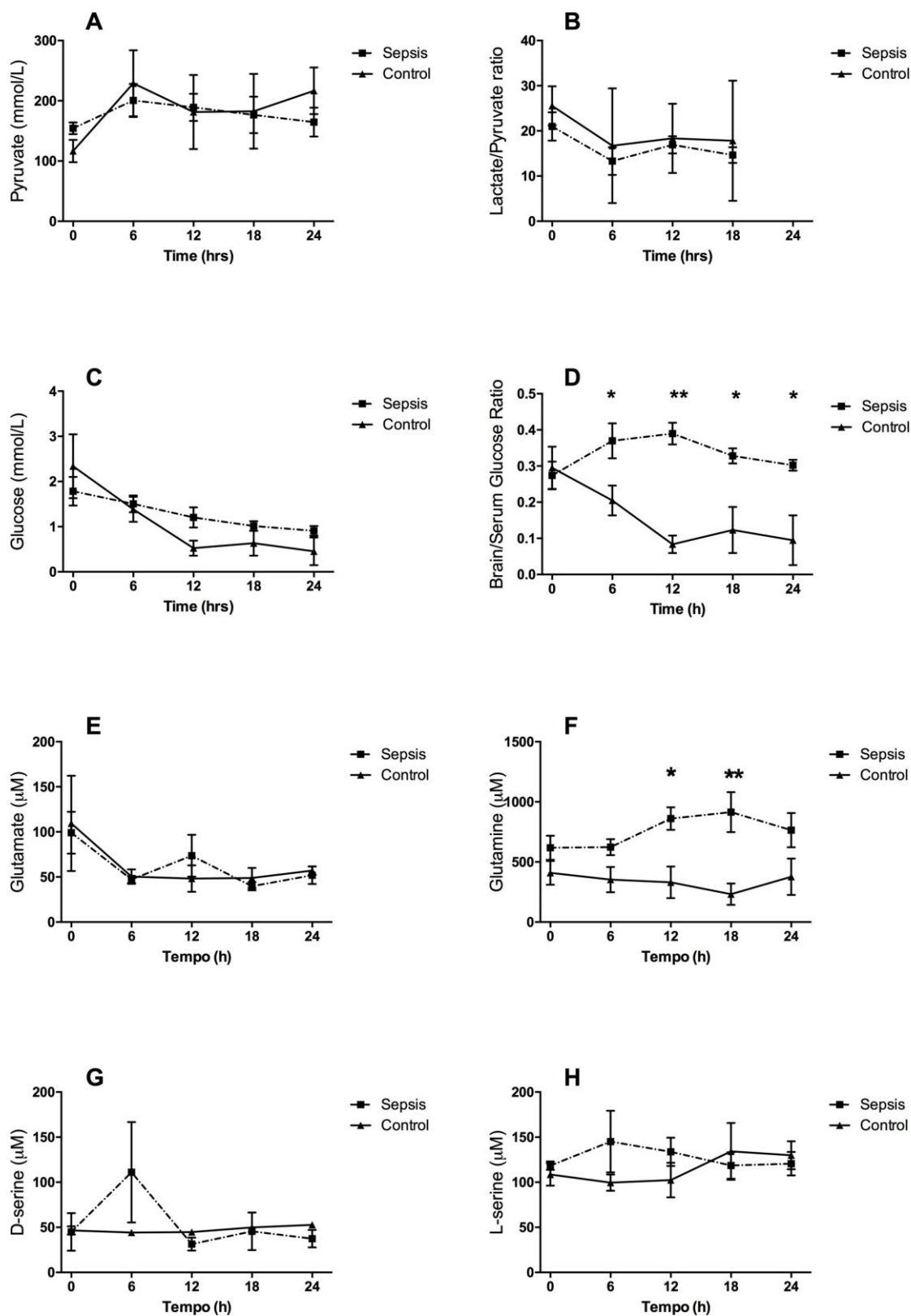


Figure 2.

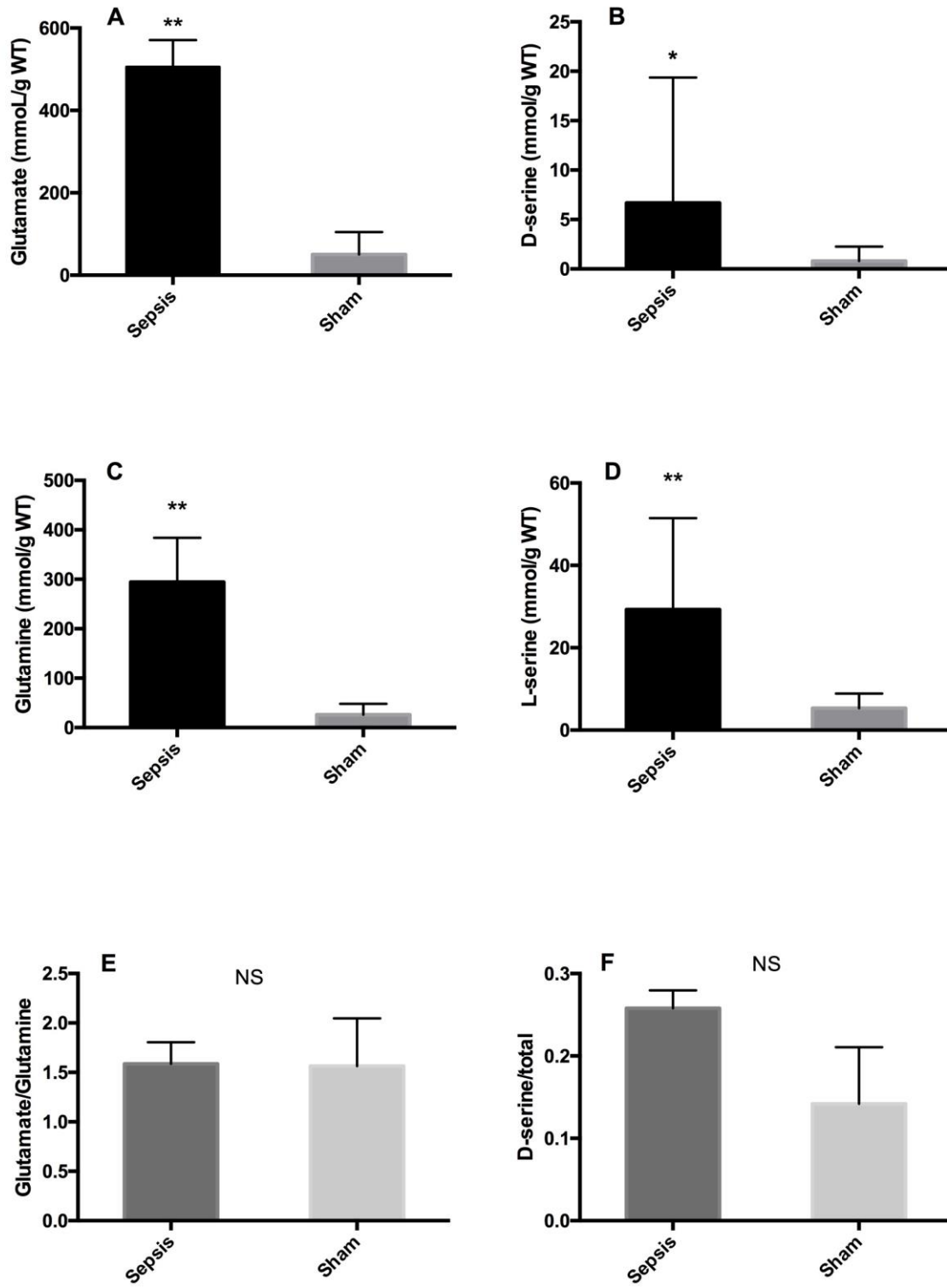


Figure 3.

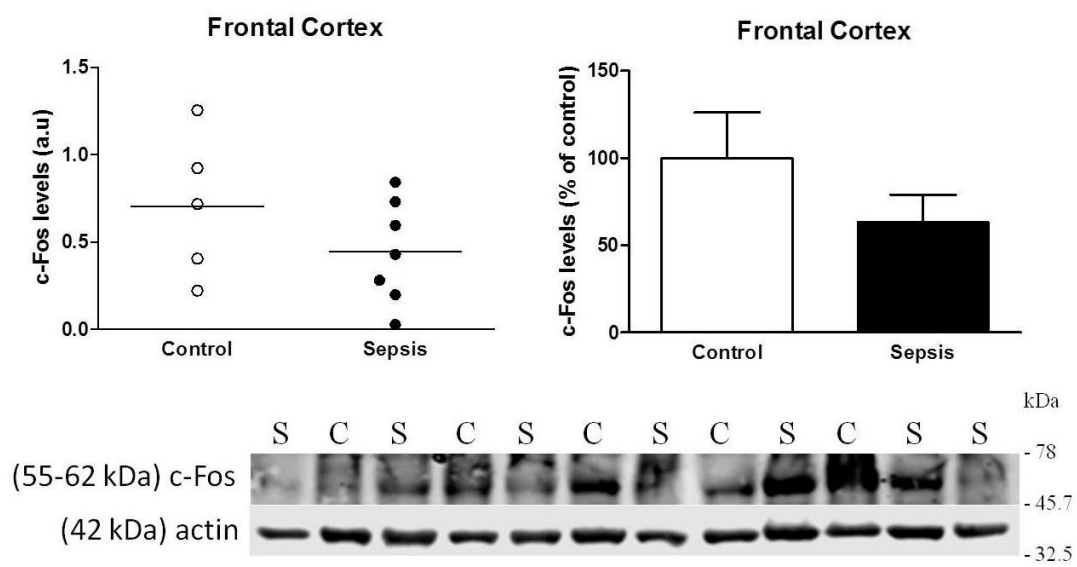
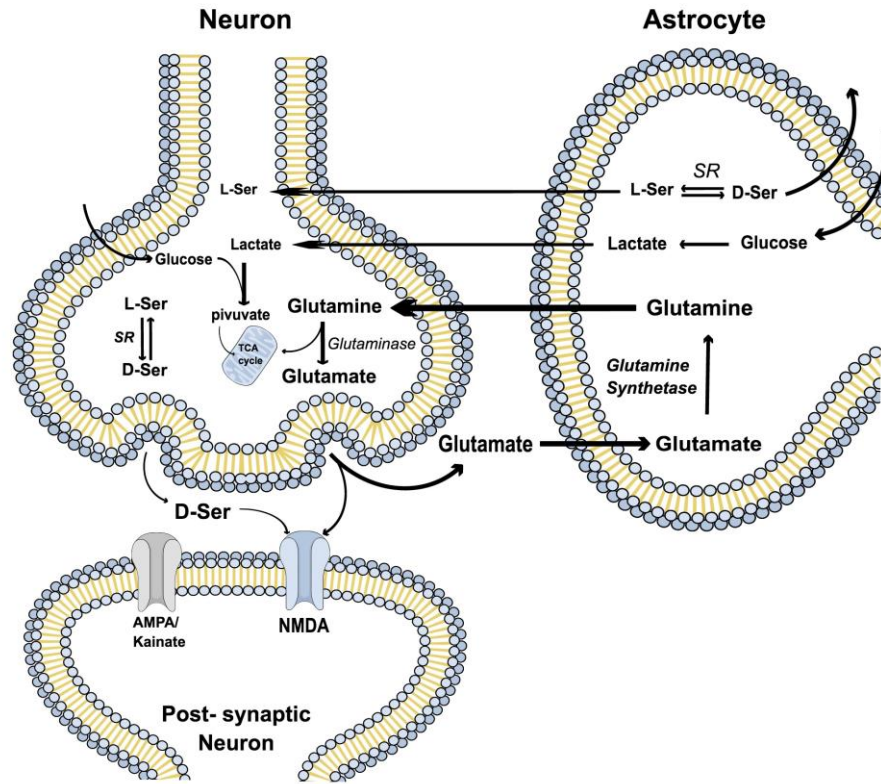


Figure 4.



REFERENCES

1. Sharshar T, Porcher R, Siami S, Rohaut B, Bailly-Salin J, Hopkinson NS, et al. Brainstem responses can predict death and delirium in sedated patients in intensive care unit. *Crit Care Med*. 2011;39(8):1960-7.
2. Azabou E, Magalhaes E, Braconnier A, Yahiaoui L, Moneger G, Heming N, et al. Early Standard Electroencephalogram Abnormalities Predict Mortality in Septic Intensive Care Unit Patients. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139969.
3. Polito A, Eischwald F, Maho AL, Polito A, Azabou E, Annane D, et al. Pattern of brain injury in the acute setting of human septic shock. *Crit Care*. 2013;17(5):R204.
4. Ely EW, Shintani A, Truman B, Speroff T, Gordon SM, Harrell FE, Jr., et al. Delirium as a predictor of mortality in mechanically ventilated patients in the intensive care unit. *JAMA*. 2004;291(14):1753-62.
5. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 2010;304(16):1787-94.
6. 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.
7. Magistretti PJ, Allaman I. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron*. 2015;86(4):883-901.
8. Palmieri EM, Menga A, Lebrun A, Hooper DC, Butterfield DA, Mazzone M, et al. Blockade of Glutamine Synthetase Enhances Inflammatory Response in Microglial Cells. *Antioxid Redox Signal*. 2016.
9. Toklu HZ, Uysal MK, Kabasakal L, Sirvanci S, Ercan F, Kaya M. The effects of riluzole on neurological, brain biochemical, and histological changes in early and late term of sepsis in rats. *J Surg Res*. 2009;152(2):238-48.
10. d'Avila JC, Santiago AP, Amancio RT, Galina A, Oliveira MF, Bozza FA. Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Crit Care Med*. 2008;36(6):1925-32.
11. Taccone FS, Su F, De Deyne C, Abdellhai A, Pierrakos C, He X, et al. Sepsis is associated with altered cerebral microcirculation and tissue hypoxia in experimental peritonitis. *Crit Care Med*. 2014;42(2):e114-22.

12. Hernandez 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.
13. Hutchinson PJ, Jalloh I, Helmy A, Carpenter KL, Rostami E, Bellander BM, et al. Consensus statement from the 2014 International Microdialysis Forum. *Intensive Care Med*. 2015;41(9):1517-28.
14. de Azevedo LC, Park M, Noritomi DT, Maciel AT, Brunialti MK, Salomao R. Characterization of an animal model of severe sepsis associated with respiratory dysfunction. *Clinics (Sao Paulo)*. 2007;62(4):491-8.
15. Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Hayashi T. Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cysteine and o-phthalaldehyde. *J Chromatogr*. 1992;582(1-2):41-8.
16. Madeira C, Lourenco MV, Vargas-Lopes C, Suemoto CK, Brandao CO, Reis T, et al. d-serine levels in Alzheimer's disease: implications for novel biomarker development. *Transl Psychiatry*. 2015;5:e561.
17. Rosario AL, Park M, Brunialti MK, Mendes M, Rapozo M, Fernandes D, et al. SvO(2)-guided resuscitation for experimental septic shock: effects of fluid infusion and dobutamine on hemodynamics, inflammatory response, and cardiovascular oxidative stress. *Shock*. 2011;36(6):604-12.
18. Taccone FS, Su F, Pierrakos C, He X, James S, Dewitte O, et al. Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study. *Crit Care*. 2010;14(4):R140.
19. Semmler A, Hermann S, Mormann F, Weberpals M, Paxian SA, Okulla T, et al. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *J Neuroinflammation*. 2008;5:38.
20. Novy J, Allenbach G, Bien CG, Guedj E, Prior JO, Rossetti AO. FDG-PET hyperactivity pattern in anti-NMDAr encephalitis. *J Neuroimmunol*. 2016;297:156-8.
21. Jurcovicova J. Glucose transport in brain - effect of inflammation. *Endocr Regul*. 2014;48(1):35-48.
22. Alle H, Roth A, Geiger JR. Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science*. 2009;325(5946):1405-8.
23. Rangaraju V, Calloway N, Ryan TA. Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. *Cell*. 2014;156(4):825-35.

24. McKenna MC. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res.* 2007;85(15):3347-58.
25. Schousboe A, Scafidi S, Bak LK, Waagepetersen HS, McKenna MC. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. *Adv Neurobiol.* 2014;11:13-30.
26. Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, et al. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(9):4926-31.
27. Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, et al. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell.* 2006;125(4):775-84.
28. Sharshar T, Bastuji-Garin S, Polito A, De Jonghe B, Stevens RD, Maxime V, et al. Hormonal status in protracted critical illness and in-hospital mortality. *Crit Care.* 2011;15(1):R47.
29. Moraes CA, Santos G, de Sampaio e Spohr TC, D'Avila JC, Lima FR, Benjamim CF, et al. Activated Microglia-Induced Deficits in Excitatory Synapses Through IL-1beta: Implications for Cognitive Impairment in Sepsis. *Mol Neurobiol.* 2015;52(1):653-63.
30. Porras OH, Loaiza A, Barros LF. Glutamate mediates acute glucose transport inhibition in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2004;24(43):9669-73.
31. Bak LK, Schousboe A, Sonnewald U, Waagepetersen HS. Glucose is necessary to maintain neurotransmitter homeostasis during synaptic activity in cultured glutamatergic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(10):1285-97.
32. Stobart JL, Anderson CM. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:38.
33. Magistretti PJ, Chatton JY. Relationship between L-glutamate-regulated intracellular Na⁺ dynamics and ATP hydrolysis in astrocytes. *J Neural Transm (Vienna).* 2005;112(1):77-85.
34. Schramm P, Klein KU, Falkenberg L, Berres M, Closhen D, Werhahn KJ, et al. Impaired cerebrovascular autoregulation in patients with severe sepsis and sepsis-associated delirium. *Crit Care.* 2012;16(5):R181.
35. Goodson CM, Rosenblatt K, Rivera-Lara L, Nyquist P, Hogue CW. Cerebral Blood Flow Autoregulation in Sepsis for the Intensivist: Why Its Monitoring May Be the Future of Individualized Care. *J Intensive Care Med.* 2016.

5 ARTIGO 2:

Acute Brain Dysfunction in Sepsis: Electroencephalographic Changes are Associated with Delirium and Mortality

Pedro Kurtz; Cassia Righy; Ligia Rabello; Daniel PA Santos; Grazielle Vianna; Aline Reis; Cristiane Cairus; William Vianna, Jorge Salluh; Tarek Sharshar; Fernando A Bozza

Corresponding author:

Fernando A Bozza

Instituto Nacional de Infectologia, Fundação Oswaldo Cruz and Instituto D'Or de Ensino e Pesquisa

Rio de Janeiro, Brazil

T + 55 21 99303 1551

bozza.fernando@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Acute brain dysfunction is a predictor of increased mortality and long-term cognitive impairment in patients with sepsis admitted to the intensive care unit (ICU). Electroencephalogram (EEG) abnormalities are common in the acute stages of sepsis and correlate with the severity of systemic and brain dysfunction. The objective of this study was to describe the association between continuous EEG abnormalities, brain dysfunction and mortality in patients with severe sepsis and septic shock.

Methods: This was a prospective, observational study, conducted in 2 centers. Continuous EEG for 12 hours was performed in patients acutely admitted in ICU for severe sepsis and septic shock from community-acquired infection, within 72 hours from admission. EEG was analyzed for its baseline rhythm, presence of epileptiform activity and according to Synek's and Young's classification. Neurological examination, including assessment of delirium, coma, brain stem reflexes and level of sedation were assessed daily for 14 days. We analyzed the relationships between physiologic variables, EEG findings, delirium and mortality.

Results: Thirty-three patients were included, mean age was 77 (47 – 81) years and 18 (55%) were female. Continuous EEG was performed for a duration of 10 (4 – 12) hours. Eight patients (24%) developed septic shock and 6 (18%) were mechanically ventilated. Overall, 8 patients (24%) developed delirium, 2 (6%) had subsyndromal delirium and 7 (21%) patients died in the hospital. EEG recordings showed background slowing (theta or delta frequency range) in 13 (39%) patients. Absence of EEG reactivity was observed in 2 patients (6%), periodic epileptiform discharges (PEDs) in

4 (12%) and no electrographic seizures were recorded. Moreover Synek's score ≥ 3 was found in 7 (21%) patients. Organ failure and deranged systemic physiologic parameters were more frequent in patients with altered EEG. In patients that developed delirium or subsyndromal delirium, EEG with a Synek's score ≥ 3 and abnormal Young score were more frequent than in those without brain dysfunction (50% vs 9%, $P=0.02$ and 80% vs 22%, $P=0.005$, respectively). Moreover, among nonsurvivors a malignant Synek's score, abnormal Young score, higher SOFA on admission and the presence of delirium or subsyndromal delirium were more frequent than among survivors.

Conclusions: In this prospective study of 33 patients with severe sepsis or septic shock, continuous EEG with a malignant pattern based on Synek's score or abnormal Young score were associated with delirium or subsyndromal delirium and hospital mortality.

INTRODUCTION

Acute brain dysfunction in sepsis is characterized by altered mental status, including delirium and coma. Patients with sepsis and brain dysfunction have higher short-term mortality and worse long-term cognitive impairment (1-3).

Electroencephalographic abnormalities have been shown to reflect the severity of SAE (4). Although retrospective studies showed that electrographic seizures are frequent and associated with mortality in septic patients (5, 6), prospective data and a recent systematic review found conflicting results (7-9). In a prospective cohort of 98 patients with sepsis monitored with continuous EEG (cEEG) Gilmore and colleagues showed that periodic discharges and non convulsive seizures were common during sepsis but failed to demonstrate an association with outcome (ref). Another recent prospective study of 110 patients with sepsis, monitored with standard EEG in the first 3 days of admission to the ICU, showed that electrographic seizures occurred in 15% of patients and were associated with delirium at the time of recording (ref). Delta-predominant activity was also related to subsequent occurrence of delirium. Both studies found absent EEG reactivity to independently predict mortality. Moreover, both failed to confirm previous findings of a strong association between non-convulsive seizures or periodic epileptiform discharges and worse outcome.

The objectives of this study were to assess the impact of EEG abnormalities on the outcome of patients admitted to the ICU for sepsis and the relationship between early EEG findings and delirium.

METHODS

Study population

This prospective observational study was conducted according to the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (10) guidelines (10). We screened all consecutive patients admitted to intensive care units of 2 hospitals (Copa D'or Hospital and Quinta D'or Hospital, Rio de Janeiro, Brazil) between August 2015 and August 2016. Approval was obtained by the local ethics committee, Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (CAAE: 19752613.9.1001.5249), prior to conducting the study. The study protocol was approved by the local institutional review board and written informed consent was obtained from the patient or the legal representatives. Patients were eligible for the study if they were 18 years or older and were admitted to the ICU for community acquired sepsis, defined by international criteria (11). Patients were excluded if they presented any of the following conditions: high probability of death within 48 hours, admitted for palliative care, expected ICU length of stay less than 48 hours, previous diagnosis of dementia or neurodegenerative disease and refusal by the patient's legal representative to participate in the study.

Baseline clinical data

The following data was collected at the time of inclusion: age, gender, date of admission, prior functional status assessed by the Lawton Instrumental Activities of Daily Living (IADL)(12). The Lawton IADL was used to screen patients with preserved functional status and a score lower than 7 was required for inclusion. Baseline medical data included medical history, initial severity assessed by the SAPS 3 score, severity of organ failure assessed by the SOFA score (Sepsis-related Organ Failure Assessment), source of infection and bacteriological documentation. Biological data were collected on inclusion and during ICU admission daily for 14 days or until ICU discharge including platelets, bilirubin, creatinine, PO₂, glycemias, sodium, arterial lactate, pH and SOFA score. Consciousness and alertness were assessed in non-sedated patients by means of the Glasgow Coma Score (GCS) and delirium was assessed by means of the confusion assessment method for the intensive care unit (CAM- ICU) scale (13, 14). Persistent delirium was defined as 2 or more days of positive CAM-ICU (15) and subsyndromal delirium was defined as one altered aspect but a non positive CAM-ICU (16). In sedated patients, the type of sedative was recorded and depth of sedation was assessed daily using the Richmond Agitation Sedation Scale (RASS) (17). Coma was defined as either a GCS<9 in non sedated patients or RASS≤-4. Sepsis was defined as the presence of infection, probable or documented, together with systemic manifestations of infection (11). Severe sepsis was defined as sepsis plus sepsis-induced organ dysfunction. Septic shock was defined as sepsis-induced hypotension persisting despite adequate fluid resuscitation.

EEG recordings and analysis

Continuous EEG was recorded, within 72 hours of ICU admission, using 21 electrodes placed by an EEG technologist according to the international 10-20 system and interpreted by a board certified electroencephalographer. Methodology for EEG recordings and analysis followed guidelines of the International Federation of Clinical Neurophysiology for the use of EEG in the ICU (18-20). We recorded the occurrence of convulsive seizures (CSz), non convulsive seizures (NCSz), convulsive status epilepticus (CSE), non convulsive status epilepticus (NCSE), and periodic epileptiform discharges (PEDs) (including generalized periodic epileptiform discharges [GPEDs], periodic lateralized epileptiform discharges [PLEDs], acute discharges with triphasic morphology, stimulus-induced periodic, rhythmic and ictal appearing discharges [SIRPIDs] and intermittent rhythmic delta activity [IRDA]), as defined previously(21-25). EEG reactivity was assessed by strong sound stimuli followed by pain stimuli. Reactivity was considered present when amplitude and/or frequency change following stimulation. The development of SIRPIDs was not considered as reactive. EEG findings were recorded and stored in a preconfigured electronic CRF. Electrographic seizures were defined as the presence of rhythmic discharges or spike and wave pattern either with a clear evolution in frequency, location or morphology, or with a sustained frequency of 3 Hz or greater, and lasting for at least 10 seconds. Convulsive seizures were defined as seizure activity on cEEG and a report describing generalized tonic-clonic seizures, convulsions or rhythmic jerking or twitching. In the absence of these descriptions and the presence of electrographic seizures, they were recorded as nonconvulsive. NCSz and NCSE were pooled together for subsequent analysis. Subsequently, EEGs were categorized according to the Synek and Young classifications (4, 26). The EEG classification developed by Synek includes: grade 0: normal EEG; grade 1: predominant alpha activity with or without some delta-theta

activity; grade 2: predominant theta or delta activity with some alpha activity still detectable; grade 3: predominant theta or delta activity, no alpha activity; grade 4: low-voltage delta activity, burst suppression, alpha coma, theta coma, PEDs, epileptiform paroxysms, a massive low-voltage background activity; and grade 5: electro-cerebral silence. The Young classification in septic encephalopathy ranges from 0 to 4, with grade 0: normal EEG; grade 1: predominant theta activity; grade 2: predominant delta activity; grade 3: predominant triphasic waves; and grade 4: suppression. Outcome data was collected until day 28 of hospitalization or until ICU discharge. We also recorded duration of mechanical ventilation, occurrence and duration of delirium and subsyndromal delirium, using the CAM-ICU score, ICU and hospital length of stay. EEGs were analyzed off-line by 2 physicians (DS and PK), blinded to clinical data. Any disagreements were resolved by consensus reading.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 23.0 (IBM Corp Armonk, NY). Categorical variables were expressed as numbers and percentages and compared by Fisher's exact test. Quantitative variables were presented as median, interquartile range [IQR] and compared using the Mann-Whitney test for nonparametric data. Associations were considered statistically significant when the p-value was less than or equal to 0.05.

RESULTS

Patient baseline characteristics

From August 2015 to August 2016, 589 patients were admitted for sepsis in the ICUs of the study. Overall, 108 patients were included in a clinical observational study. Of these, 75 did not undergo EEG (in the first 72 hours and were excluded from the EEG study. The reasons for not performing EEG were either patient refusal or exam unavailable (Figure 1). Median duration of cEEG was 10 (4–12) hours and the median day from admission to EEG was 1 (1–2). Patient characteristics are presented in Table 1. Eighteen (55%) were female and 2 (6%) had previous stroke without neurological sequelae. Urinary tract infection and community acquired pneumonia were the most frequent causes of sepsis accounting for 46% and 36%, respectively. Eight (24%) patients were mechanically ventilated and 6 (18%) had septic shock on inclusion. Admission SOFA was 4 (2.5 – 4.5) and non-neuro SOFA was 3 (2 – 4). Five patients were sedated at 72 hours after admission with Midazolam (2) or Dexmedetomidine (3). Delirium developed in 8 (24%) patients and 7 of these had persistent delirium (2 or more days). Two other patients had a negative CAM-ICU but scored at least 1 point and were classified as subsyndromal delirium (Table 1).

EEG findings, coma and delirium

The EEG background rhythms were as follows: alpha 61%, theta 33% and delta 6%. No patients presented electrographic seizures during EEG monitoring and periodic epileptiform discharges were only found in the EEGs of 3 patients (9%). Reactivity was absent in only 2 patients (6%) (Table 2). Two patients were sedated during cEEG monitoring and the sedatives used were midazolam, propofol and dexmedetomidine. Delirium was present in 2 patients during cEEG and 6 other patients subsequently developed delirium in the ICU. Coma (RASS \leq -4 or GCS $<$ 9) or delirium developed in 10 patients during the study period. Sedation at 72 hours after admission, malignant SYNEK and abnormal Young were associated with the development of delirium (Table 3). When patients that developed delirium or subsyndromal delirium were evaluated (N=10), continuous sedation, initial non-neuro SOFA score, malignant SYNEK and abnormal Young were more common (Table 5). Importantly, analysis of the first hour of EEG did not identify the periodic epileptiform discharges (PEDs) found in 4 patients when the complete period of monitoring was analyzed. All the other results, including reactivity and the Synek and Young scale scores, were similar between the first hour and the complete analysis.

EEG findings and mortality

Overall, 7 patients (21%) died during the hospital stay. Among nonsurvivors, older age and higher initial SOFA were more common. The presence of delirium or subsyndromal delirium were also more frequent among nonsurvivors. The EEG findings associated with mortality were absent reactivity, malignant SYNEK score and abnormal Young score (Table 6).

DISCUSSION

In this prospective observational study we found that early EEG findings, as evaluated by the Synek and Young scales, were associated with delirium and hospital mortality in patients admitted with severe sepsis or septic shock. Abnormal EEG patterns, predominantly severe slowing with Delta background, were also associated with the combined outcomes of coma or delirium and delirium or subsyndromal delirium.

In comparison to previous prospective studies of the use of EEG in sepsis, our cohort differs in key aspects (7, 8). In our study all consecutive patients admitted for sepsis in the ICU were screened. Gilmore and colleagues included patients with altered mental status and clinical indication of continuous EEG monitoring. In their study, 76% of patients were comatose, more than 50% had acute liver or renal failure and hospital mortality was 44% (8). More recently Azabou and colleagues (2015) reported on 110 septic patients that underwent standard EEG during the first 72 hours of admission. Although mortality was similar to our cohort, patients in their study were more frequently mechanically ventilated (55%) and sedated (42%) at the time EEG was performed. Moreover, neurological and functional premorbid status did not preclude inclusion to the study (7). In contrast, we performed the Lawton Instrumental Activities of Daily Living (IADL) previous to inclusion and patients with a score higher than 7 were not included. We also excluded patients with severe dementia and previous neurological compromise. The inclusion of patients without previous neurological and functional impairment probably influenced the rate of acute brain dysfunction and EEG findings of our study.

Status epilepticus and electrographic seizures were not found in our patients and epileptiform activity was uncommon. Previous retrospective studies (5, 6, 27) in the medical and surgical ICU, including patients with sepsis, reported more than 20% of patients with electrographic seizures or periodic epileptiform discharges (PEDs). Although sepsis was an independent predictor of seizures or PEDs in one study, this was not confirmed by other authors, including a recent systematic review on the topic (9). Another controversial finding of retrospective studies is the impact of electrographic seizures on the outcome of non-neurological patients (4-6, 27). A systematic review and 2 subsequent prospective studies of EEG in severe sepsis and septic shock failed to show an association between seizures and PEDs with mortality or unfavorable outcome (7-9). Since only 4 patients had PEDs in our study and none had electrographic seizures we could not analyze this relationship. Based on the limited data available, we can hypothesize that septic patients at high risk of developing epileptiform activity are those with predisposing neurological conditions, severe organ failure and coma. Moreover, it is still unclear if seizures/PEDs found in sepsis are a marker of increased severity or inflict further secondary brain injury.

We compared changes in the first hour of EEG (standard) to findings during the complete period of monitoring (continuous). Interestingly, the 4 patients that developed PEDs did not present any epileptiform activity during the first hour. Although epileptiform activity was uncommon in our study, this highlights the importance of continuous EEG for the detection of ictal and interictal activity in high risk patients. There was no difference in reactivity or in the Synek and Young classifications between standard and continuous monitoring.

We found associations between hospital mortality, brain dysfunction and abnormal EEG findings based on the Synek and Young scales. The alterations were

predominantly related to moderate and severe background slowing. A Synek ≥ 3 and a Young scale ≥ 1 were associated with the presence of delirium, delirium or coma and hospital mortality. This confirms previous findings that early changes in EEG patterns may help predict the development of sepsis-associated brain dysfunction (7). Moreover, severely altered EEGs and acute brain dysfunction are associated with increased mortality in patients with severe sepsis and septic shock.

Our study has some important limitations. First, the small sample size limits our ability to study independent predictors of brain dysfunction and outcome. Second, the exclusion of patients with premorbid functional impairment limits our findings to a neurologically healthier group of septic patients and may have affected the rate of EEG changes found. The study design also favored the inclusion of less severe septic patients. This may explain the high rate of close-to-normal EEGs and the high survival rate. Third, we did not evaluate functional outcome of patients. The presence of acute brain dysfunction (and potentially of EEG changes) may have small attributable mortality but is a consistent predictor of long-term cognitive impairment.

CONCLUSION

In this prospective observational study of 33 patients with severe sepsis and septic shock, we found that early changes in continuous EEG are associated with acute brain dysfunction and hospital mortality.

REFERENCES

1. Eidelman LA, Putterman D, Putterman C, Sprung CL. The spectrum of septic encephalopathy. Definitions, etiologies, and mortalities. *JAMA*. 1996;275(6):470-3.
2. Annane D, Sharshar T. Cognitive decline after sepsis. *Lancet Respir Med*. 2015;3(1):61-9.
3. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 2010;304(16):1787-94.
4. Young GB, Bolton CF, Archibald YM, Austin TW, Wells GA. The electroencephalogram in sepsis-associated encephalopathy. *J Clin Neurophysiol*. 1992;9(1):145-52.
5. Kurtz P, Gaspard N, Wahl AS, Bauer RM, Hirsch LJ, Wunsch H, et al. Continuous electroencephalography in a surgical intensive care unit. *Intensive Care Med*. 2014;40(2):228-34.
6. Oddo M, Carrera E, Claassen J, Mayer SA, Hirsch LJ. Continuous electroencephalography in the medical intensive care unit. *Crit Care Med*. 2009;37(6):2051-6.
7. Azabou E, Magalhaes E, Braconnier A, Yahiaoui L, Moneger G, Heming N, et al. Early Standard Electroencephalogram Abnormalities Predict Mortality in Septic Intensive Care Unit Patients. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139969.
8. Gilmore EJ, Gaspard N, Choi HA, Cohen E, Burkart KM, Chong DH, et al. Acute brain failure in severe sepsis: a prospective study in the medical intensive care unit utilizing continuous EEG monitoring. *Intensive Care Med*. 2015;41(4):686-94.
9. Hosokawa K, Gaspard N, Su F, Oddo M, Vincent JL, Taccone FS. Clinical neurophysiological assessment of sepsis-associated brain dysfunction: a systematic review. *Crit Care*. 2014;18(6):674.
10. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gotsche PC, Vandenbroucke JP, et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: guidelines for reporting observational studies. *Int J Surg*. 2014;12(12):1495-9.

11. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* 2013;39(2):165-228.
12. Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist.* 1969;9(3):179-86.
13. Ely EW, Inouye SK, Bernard GR, Gordon S, Francis J, May L, et al. Delirium in mechanically ventilated patients: validity and reliability of the confusion assessment method for the intensive care unit (CAM-ICU). *JAMA.* 2001;286(21):2703-10.
14. Ely EW, Margolin R, Francis J, May L, Truman B, Dittus R, et al. Evaluation of delirium in critically ill patients: validation of the Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit (CAM-ICU). *Crit Care Med.* 2001;29(7):1370-9.
15. Patel SB, Poston JT, Pohlman A, Hall JB, Kress JP. Rapidly reversible, sedation-related delirium versus persistent delirium in the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;189(6):658-65.
16. Ouimet S, Riker R, Bergeron N, Cossette M, Kavanagh B, Skrobik Y. Subsyndromal delirium in the ICU: evidence for a disease spectrum. *Intensive Care Med.* 2007;33(6):1007-13.
17. Sessler CN, Gosnell MS, Grap MJ, Brophy GM, O'Neal PV, Keane KA, et al. The Richmond Agitation-Sedation Scale: validity and reliability in adult intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(10):1338-44.
18. Guerit JM, Amantini A, Amodio P, Andersen KV, Butler S, de Weerd A, et al. Consensus on the use of neurophysiological tests in the intensive care unit (ICU): electroencephalogram (EEG), evoked potentials (EP), and electroneuromyography (ENMG). *Neurophysiol Clin.* 2009;39(2):71-83.
19. Herman ST, Abend NS, Bleck TP, Chapman KE, Drislane FW, Emerson RG, et al. Consensus statement on continuous EEG in critically ill adults and children, part I: indications. *J Clin Neurophysiol.* 2015;32(2):87-95.
20. Herman ST, Abend NS, Bleck TP, Chapman KE, Drislane FW, Emerson RG, et al. Consensus statement on continuous EEG in critically ill adults and children, part II: personnel, technical specifications, and clinical practice. *J Clin Neurophysiol.* 2015;32(2):96-108.
21. Claassen J, Mayer SA, Kowalski RG, Emerson RG, Hirsch LJ. Detection of electrographic seizures with continuous EEG monitoring in critically ill patients. *Neurology.* 2004;62(10):1743-8.

22. Chong DJ, Hirsch LJ. Which EEG patterns warrant treatment in the critically ill? Reviewing the evidence for treatment of periodic epileptiform discharges and related patterns. *J Clin Neurophysiol.* 2005;22(2):79-91.
23. Hirsch LJ, Claassen J, Mayer SA, Emerson RG. Stimulus-induced rhythmic, periodic, or ictal discharges (SIRPIDs): a common EEG phenomenon in the critically ill. *Epilepsia.* 2004;45(2):109-23.
24. Foreman B, Claassen J, Abou Khaled K, Jirsch J, Alschuler DM, Wittman J, et al. Generalized periodic discharges in the critically ill: a case-control study of 200 patients. *Neurology.* 2012;79(19):1951-60.
25. Foreman B, Mahulikar A, Tadi P, Claassen J, Szaflarski J, Halford JJ, et al. Generalized periodic discharges and 'triphase waves': A blinded evaluation of inter-rater agreement and clinical significance. *Clin Neurophysiol.* 2016;127(2):1073-80.
26. Synek VM. EEG abnormality grades and subdivisions of prognostic importance in traumatic and anoxic coma in adults. *Clin Electroencephalogr.* 1988;19(3):160-6.
27. Young GB, Kreeft JH, McLachlan RS, Demelo J. EEG and clinical associations with mortality in comatose patients in a general intensive care unit. *J Clin Neurophysiol.* 1999;16(4):354-60.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Flow chart of the studied population

TABLES

Table 1. Patient characteristics (n=33)

Variables		N (%) or Median (IQR)
Age		77 (47 – 81)
Female		18 (55)
Comorbidities	Diabetes melitus	7 (21)
	Stroke	2 (6)
Infection site	Pulmonary	12 (36)
	Urinary	15 (46)
	Abdominal	3 (9)
	Blood	1 (3)
	Soft tissue	1 (3)
Others		1 (3)
Septic shock		8 (24)
Acute Renal Failure	Creatinine increase >50%	6 (18)
	Hemodialysis	3 (9)
Mechanical Ventilation		6 (18)
Delirium	≥ 1 day	8 (24)
	≥ 2 days	7 (21)
	Sub-syndromic	2 (6)
Coma or Delirium		10 (30)
Continuous IV sedatives	Inclusion	7 (21)
	First 48 hours	4 (12)
	First 72 hours	5 (15)
Sedative drug used in the first 72h	Midazolam	2 (6)
	Propofol	2 (6)

Dexmedetomidine	3 (9)
SAPS 3	53 (43 – 61)
Initial SOFA	4 (2.5 – 4.5)
Initial SOFA non-neuro	3 (2 – 4)
ICU mortality	4 (12)
Hospital mortality	7 (21)

SAPS: Symplified Acute Physiology Score; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; ICU: Intensive Care Unit

Table 2. EEG findings

Variable		N (%)
NCSE		0
NCSz		0
PEDs		3 (9)
EDs		4 (12)
SZ or PEDs		3 (9)
PLEDs		1 (3)
GPEDs		0
Triphasic		0
SIRPIDs		0
FIRDA		1 (3)
IRDA		1(3)
Dominant freq.		
	Alpha	20 (61)
	Teta	11 (33)
	Delta	2 (6)
Absent Reactivity		2 (6)
Slow waves		5 (15)
Beta		9 (27)
SYNEK	1	20 (61)
	2	6 (18)
	3	6 (18)
	4	1 (3)
Young	0	20 (61)
	1	11 (33)
	2	1 (3)
	3	1 (3)
	4	0

NCSE: non convulsive status epilepticus; NCSz: non convulsive seizures; PEDs: periodic epileptiform discharges; EDs epileptiform discharges; Sz: seizures; PLEDs: periodic lateralized epileptiform discharges; GPEDs: generalized epileptiform discharges; SIRPIDs: stimulus-induced rhythmic, periodic or ictal discharges; FIRDA: frontal intermittent rhythmic delta activity; IRDA: intermittent rhythmic delta activity.

Table 3. Clinical data and EEG findings in patients that developed delirium

	No Delirium (N=25)	Delirium (N=8)	P value
Age	68 (50 – 86)	80 (73 – 87)	0.1
Initial SOFA	3 (2 – 4)	4.5 (2.5 – 6.5)	0.03
Initial SOFA non-neuro	3 (1.5 – 4.5)	4 (2 – 6)	0.06
Epileptiform discharges	2 (8)	2 (25)	0.2
Reactivity absent	1 (4)	1 (13)	0.4
Sedation first 72h	1 (4)	4 (50)	0.008
SYNEK malignant	3 (12)	4 (50)	0.04
Young > 0	6 (24)	7 (88)	0.003

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; SYNEK malignant: SYNEK score ≥ 3 .

Table 4. Clinical data and EEG findings in patients that developed persistent delirium (2 or more days)

	No Delirium (N=26)	Delirium (N=7)	P value
Age	68 (50 – 86)	79 (73 – 85)	0.4
Initial SOFA	3 (2 – 4)	4 (1.5 – 6.5)	0.05
Initial SOFA non-neuro	3 (1.5 – 4.5)	4 (1.5 – 6.5)	0.09
Epileptiform discharges	2 (8)	2 (29)	0.2
Sedation first 72h	1 (4)	4 (57)	0.004
SYNEK malignant	4 (15)	3 (43)	0.1
Young > 0	7 (27)	6 (86)	0.008

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; SYNEK malignant: SYNEK score ≥ 3 .

Table 5. Clinical data and EEG findings in patients that developed delirium or subsyndromal delirium

	No Delirium (N=23)	Delirium (N=10)	P value
Age	68 (50 – 86)	78 (67 – 89)	0.3
Initial SOFA non-neuro	3 (1.5 – 4.5)	5.5 (3.5 – 7.5)	0.003
SOFA renal	0 (0 – 1)	1.5 (0 – 3)	0.03
Epileptiform discharges	1 (4)	3 (30)	0.07
Reactivity	1 (4)	1 (10)	0.5
Sedation first 72h	1 (4)	4 (40)	0.02
SYNEK malignant	2 (9)	5 (50)	0.02
Young > 0	5 (22)	8 (80)	0.005

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; SYNEK malignant: SYNEK score ≥ 3 .

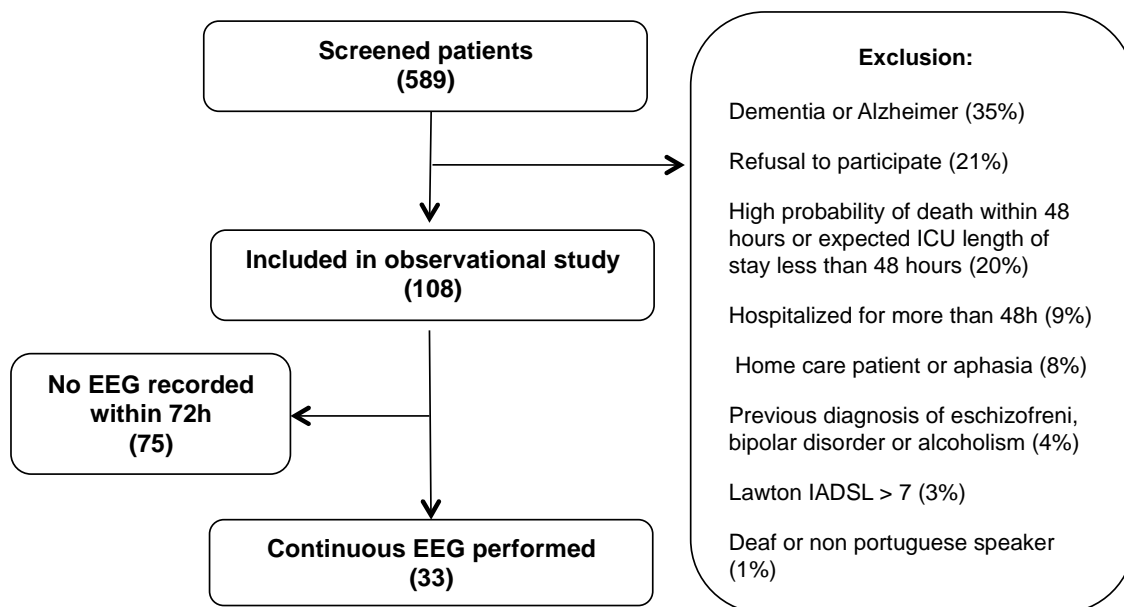
Table 6. Clinical data and EEG findings in survivors vs non survivors

	Survivor (N=26)	Nonsurvivor (N=7)	P value
Age	68 (59 – 87)	82 (77 – 87)	0.02
Initial SOFA	3 (2 – 4)	5 (3 – 7)	0.04
Initial SOFA non neuro	3 (1.5 – 4.5)	4 (2 – 6)	0.1
Delirium	4 (15)	4 (57)	0.04
Persistent Delirium (2 or more days)	4 (15)	3 (43)	0.1
Delirium or subsyndromic	5 (19)	5 (71)	0.02
Coma	2 (8)	4 (57)	0.01
Coma or Delirium	4 (15)	6 (86)	0.001
Sedatives IV first 72h	4 (15)	1 (14)	1
Epileptiform discharges	2 (8)	2 (29)	0.19
Reactivity	0 (0)	2 (29)	0.04
SYNEK malignant	2 (8)	5 (71)	0.002
Young > 0	6 (23)	7 (100)	<0.001

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; SYNEK malignant: SYNEK score ≥ 3 .

FIGURES

Figure 1



6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento de disfunção cerebral aguda associada a sepse são complexos e ainda não completamente compreendidos. A avaliação de parâmetros de função cerebral em modelos experimentais de sepse têm contribuído para o entendimento das alterações precoces que resultam em disfunção cerebral. Nossos achados corroboram evidências que sugerem que a presença de mecanismos compensatórios, como o aumento da captação cerebral de glicose e a ativação das vias glicolíticas, atuam na preservação do metabolismo energético cerebral. Além disso, sugerem que há na sepse uma exacerbação das vias glutamatérgicas, sem necessariamente resultar em aumento da neurotransmissão excitatória ou dano neuronal resultante de excitotoxicidade. É importante ressaltar que esses achados se deram na ausência de instabilidade hemodinâmica e hipotensão refratária. Apesar de não ser possível afastar alterações perfusionais associadas a alterações microcirculatórias e de autorregulação cerebral, provavelmente as alterações observadas não são consequência de isquemia cerebral. No entanto, as alterações neuroenergéticas observadas criam um ambiente vulnerável para descompensação metabólica na presença de complicações de sepse como hipotensão e hipoxemia.

A disfunção cerebral aguda associada a sepse (DCAS) é a complicação mais prevalente em pacientes com sepse grave e choque séptico. Além disso, DCAS tem impacto na mortalidade de curto prazo e leva a comprometimento cognitivo de longo prazo. No entanto, a detecção precoce de disfunção cerebral ainda é um desafio na UTI e tratamentos específicos não estão disponíveis. Alterações precoces no EEG têm se mostrado relacionadas ao desenvolvimento de disfunção cerebral em pacientes sépticos. Apesar da prevalência e do impacto de crises não convulsivas serem bastante controversos em pacientes sépticos, a presença de lentificação grave do ritmo de fundo e a ausência de reatividade têm consistentemente se mostrado marcadores de pior prognóstico e potenciais preditores de disfunção cerebral.

Mesmo com evidências ainda limitadas do papel do EEG na fase precoce da sepse grave e choque séptico, é possível recomendar sua utilização dentro de uma abordagem integrada com outros métodos de investigação neurológica, como

ressonância nuclear magnética, doppler transcraniano e potencial evocado. A indicação de cada um desses métodos, assim como a decisão entre EEG de curta duração ou monitorização contínua, deve ser baseada nas alterações neurológicas presentes. Pacientes sépticos que apresentam crises convulsivas associadas a alteração da consciência devem ser submetidos a monitorização contínua com EEG devido ao alto risco de crises eletrográficas não convulsivas. Assim como em pacientes comatosos sem causa definida, o EEG contínuo permite a detecção e tratamento de atividade epileptiforme ictal com medicações sedativas e anticonvulsivantes. A supressão dessa atividade pode potencialmente evitar lesão neurológica secundária. No grupo de pacientes com sepse e disfunção orgânica menos grave, incluindo alterações leves da consciência e delirium, um exame de EEG de curta duração parece ser suficiente. A frequência de status epilepticus não convulsivo nessa população de pacientes é menor e o EEG de curta duração se mostrou capaz de avaliar o ritmo de fundo e a reatividade a estímulos externos, ambos associados ao desenvolvimento de disfunção cerebral e à mortalidade hospitalar.

REFERÊNCIAS

- Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, and M. R. Pinsky. 2001. 'Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care', *Crit Care Med*, 29: 1303-10.
- Araujo, C. V., V. Estado, E. Tibirica, P. T. Bozza, H. C. Castro-Faria-Neto, and A. R. Silva. 2012. 'PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis', *Microvasc Res*, 84: 218-21.
- Azabou, E., E. Magalhaes, A. Braconnier, L. Yahiaoui, G. Moneger, N. Heming, D. Annane, J. Mantz, F. Chretien, M. C. Durand, F. Lofaso, R. Porcher, T. Sharshar, and Reanimation Groupe d'Explorations Neurologiques en. 2015. 'Early Standard Electroencephalogram Abnormalities Predict Mortality in Septic Intensive Care Unit Patients', *PLoS One*, 10: e0139969.
- Bartynski, W. S., J. F. Boardman, Z. R. Zeigler, R. K. Shaddock, and J. Lister. 2006. 'Posterior reversible encephalopathy syndrome in infection, sepsis, and shock', *AJNR Am J Neuroradiol*, 27: 2179-90.
- Beale, R., K. Reinhart, F. M. Brunkhorst, G. Dobb, M. Levy, G. Martin, C. Martin, G. Ramsey, E. Silva, B. Vallet, J. L. Vincent, J. M. Janes, S. Sarwat, M. D. Williams, and Progress Advisory Board. 2009. 'Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry', *Infection*, 37: 222-32.
- Bellaver, B., D. G. Souza, L. D. Bobermin, C. A. Goncalves, D. O. Souza, and A. Quincozes-Santos. 2015. 'Guanosine inhibits LPS-induced pro-inflammatory response and oxidative stress in hippocampal astrocytes through the heme oxygenase-1 pathway', *Purinergic Signal*, 11: 571-80.
- Bellaver, B., D. G. Souza, L. D. Bobermin, D. O. Souza, C. A. Goncalves, and A. Quincozes-Santos. 2015. 'Resveratrol Protects Hippocampal Astrocytes

Against LPS-Induced Neurotoxicity Through HO-1, p38 and ERK Pathways', *Neurochem Res*, 40: 1600-8.

Benardais, K., V. Gudi, L. Gai, J. Nessler, V. Singh, C. K. Prajeeth, T. Skripuletz, and M. Stangel. 2014. 'Long-term impact of neonatal inflammation on demyelination and remyelination in the central nervous system', *Glia*, 62: 1659-70.

Bergeron, N., M. J. Dubois, M. Dumont, S. Dial, and Y. Skrobik. 2001. 'Intensive Care Delirium Screening Checklist: evaluation of a new screening tool', *Intensive Care Med*, 27: 859-64.

Bone, R. C., W. J. Sibbald, and C. L. Sprung. 1992. 'The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure', *Chest*, 101: 1481-3.

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

Bozza, F. A., P. Garteiser, M. F. Oliveira, S. Doblaz, R. Cranford, D. Saunders, I. Jones, R. A. Towner, and H. C. Castro-Faria-Neto. 2010. 'Sepsis-associated encephalopathy: a magnetic resonance imaging and spectroscopy study', *J Cereb Blood Flow Metab*, 30: 440-8.

Brun-Buisson, C., F. Doyon, J. Carlet, P. Dellamonica, F. Gouin, A. Lepoutre, J. C. Mercier, G. Offenstadt, and B. Regnier. 1995. 'Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis', *JAMA*, 274: 968-74.

Carlson, D. E., W. C. Chiu, S. M. Fiedler, and G. E. Hoffman. 2007. 'Central neural distribution of immunoreactive Fos and CRH in relation to plasma ACTH and corticosterone during sepsis in the rat', *Exp Neurol*, 205: 485-500.

- Comim, C. M., G. T. Rezin, G. Scaini, P. B. Di-Pietro, M. R. Cardoso, F. C. Petronilho, C. Ritter, E. L. Streck, J. Quevedo, and F. Dal-Pizzol. 2008. 'Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation', *Mitochondrion*, 8: 313-8.
- Czura, C. J., and K. J. Tracey. 2005. 'Autonomic neural regulation of immunity', *J Intern Med*, 257: 156-66.
- d'Avila, J. C., A. P. Santiago, R. T. Amancio, A. Galina, M. F. Oliveira, and F. A. Bozza. 2008. 'Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction', *Crit Care Med*, 36: 1925-32.
- Davies, D. C. 2002. 'Blood-brain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumours', *J Anat*, 200: 639-46.
- Dombrovskiy, V. Y., A. A. Martin, J. Sunderram, and H. L. Paz. 2007. 'Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003', *Crit Care Med*, 35: 1244-50.
- Eidelman, L. A., D. Putterman, C. Putterman, and C. L. Sprung. 1996. 'The spectrum of septic encephalopathy. Definitions, etiologies, and mortalities', *JAMA*, 275: 470-3.
- Ely, E. W., S. K. Inouye, G. R. Bernard, S. Gordon, J. Francis, L. May, B. Truman, T. Speroff, S. Gautam, R. Margolin, R. P. Hart, and R. Dittus. 2001. 'Delirium in mechanically ventilated patients: validity and reliability of the confusion assessment method for the intensive care unit (CAM-ICU)', *JAMA*, 286: 2703-10.
- Ely, E. W., R. Margolin, J. Francis, L. May, B. Truman, R. Dittus, T. Speroff, S. Gautam, G. R. Bernard, and S. K. Inouye. 2001. 'Evaluation of delirium in critically ill patients: validation of the Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit (CAM-ICU)', *Crit Care Med*, 29: 1370-9.

- Ely, E. W., A. Shintani, B. Truman, T. Speroff, S. M. Gordon, F. E. Harrell, Jr., S. K. Inouye, G. R. Bernard, and R. S. Dittus. 2004. 'Delirium as a predictor of mortality in mechanically ventilated patients in the intensive care unit', *JAMA*, 291: 1753-62.
- Engel, C., F. M. Brunkhorst, H. G. Bone, R. Brunkhorst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gruendling, G. Huhle, U. Jaschinski, S. John, K. Mayer, M. Oppert, D. Olthoff, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, H. Bogatsch, C. Hartog, M. Loeffler, and K. Reinhart. 2007. 'Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study', *Intensive Care Med*, 33: 606-18.
- Foreman, B., J. Claassen, K. Abou Khaled, J. Jirsch, D. M. Alschuler, J. Wittman, R. G. Emerson, and L. J. Hirsch. 2012. 'Generalized periodic discharges in the critically ill: a case-control study of 200 patients', *Neurology*, 79: 1951-60.
- Fugate, J. E., E. M. Lam, A. A. Rabinstein, and E. F. Wijdicks. 2010. 'Acute hemorrhagic leukoencephalitis and hypoxic brain injury associated with H1N1 influenza', *Arch Neurol*, 67: 756-8.
- Gaieski, D. F., J. M. Edwards, M. J. Kallan, and B. G. Carr. 2013. 'Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States', *Crit Care Med*, 41: 1167-74.
- Gilmore, E. J., N. Gaspard, H. A. Choi, E. Cohen, K. M. Burkart, D. H. Chong, J. Claassen, and L. J. Hirsch. 2015. 'Acute brain failure in severe sepsis: a prospective study in the medical intensive care unit utilizing continuous EEG monitoring', *Intensive Care Med*, 41: 686-94.
- Girard, T. D., J. C. Jackson, P. P. Pandharipande, B. T. Pun, J. L. Thompson, A. K. Shintani, S. M. Gordon, A. E. Canonico, R. S. Dittus, G. R. Bernard, and E. W. Ely. 2010. 'Delirium as a predictor of long-term cognitive impairment in survivors of critical illness', *Crit Care Med*, 38: 1513-20.

- Granja, C., C. Dias, A. Costa-Pereira, and A. Sarmiento. 2004. 'Quality of life of survivors from severe sepsis and septic shock may be similar to that of others who survive critical illness', *Crit Care*, 8: R91-8.
- Gunther, M. L., A. Morandi, E. Krauskopf, P. Pandharipande, T. D. Girard, J. C. Jackson, J. Thompson, A. K. Shintani, S. Geevarghese, R. R. Miller, 3rd, A. Canonico, K. Merkle, C. J. Cannistraci, B. P. Rogers, J. C. Gatenby, S. Heckers, J. C. Gore, R. O. Hopkins, E. W. Ely, and VISualizing Icu SurvivOrs Neuroradiological Sequelae Visions Investigation. 2012. 'The association between brain volumes, delirium duration, and cognitive outcomes in intensive care unit survivors: the VISIONS cohort magnetic resonance imaging study*', *Crit Care Med*, 40: 2022-32.
- Hernandes, M. S., J. C. D'Avila, S. C. Trevelin, P. A. Reis, E. R. Kinjo, L. R. Lopes, H. C. Castro-Faria-Neto, F. Q. Cunha, L. R. Britto, and F. A. Bozza. 2014. 'The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis', *J Neuroinflammation*, 11: 36.
- Hoogland, I. C., C. Houbolt, D. J. van Westerloo, W. A. van Gool, and D. van de Beek. 2015. 'Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments', *J Neuroinflammation*, 12: 114.
- Hopkins, R. O., L. K. Weaver, K. J. Chan, and J. F. Orme, Jr. 2004. 'Quality of life, emotional, and cognitive function following acute respiratory distress syndrome', *J Int Neuropsychol Soc*, 10: 1005-17.
- Hosokawa, K., N. Gaspard, F. Su, M. Oddo, J. L. Vincent, and F. S. Taccone. 2014. 'Clinical neurophysiological assessment of sepsis-associated brain dysfunction: a systematic review', *Crit Care*, 18: 674.
- Hughes, C. G., P. P. Pandharipande, J. L. Thompson, R. Chandrasekhar, L. B. Ware, E. W. Ely, and T. D. Girard. 2016. 'Endothelial Activation and Blood-Brain

Barrier Injury as Risk Factors for Delirium in Critically Ill Patients', *Crit Care Med*, 44: e809-17.

Iacobone, E., J. Bailly-Salin, A. Polito, D. Friedman, R. D. Stevens, and T. Sharshar. 2009. 'Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis', *Crit Care Med*, 37: S331-6.

Iwashyna, T. J., E. W. Ely, D. M. Smith, and K. M. Langa. 2010. 'Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis', *JAMA*, 304: 1787-94.

Janig, W., and P. G. Green. 2014. 'Acute inflammation in the joint: its control by the sympathetic nervous system and by neuroendocrine systems', *Auton Neurosci*, 182: 42-54.

Japiassu, A. M., A. P. Santiago, J. C. d'Avila, L. F. Garcia-Souza, A. Galina, H. C. Castro Faria-Neto, F. A. Bozza, and M. F. Oliveira. 2011. 'Bioenergetic failure of human peripheral blood monocytes in patients with septic shock is mediated by reduced F1Fo adenosine-5'-triphosphate synthase activity', *Crit Care Med*, 39: 1056-63.

Kaukonen, K. M., M. Bailey, S. Suzuki, D. Pilcher, and R. Bellomo. 2014. 'Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012', *JAMA*, 311: 1308-16.

Kirschner, D. L., A. L. Wilson, K. L. Drew, and T. K. Green. 2009. 'Simultaneous efflux of endogenous D-ser and L-glu from single acute hippocampus slices during oxygen glucose deprivation', *J Neurosci Res*, 87: 2812-20.

Kreutzberg, G. W. 1996. 'Microglia: a sensor for pathological events in the CNS', *Trends Neurosci*, 19: 312-8.

- Kurtz, P., N. Gaspard, A. S. Wahl, R. M. Bauer, L. J. Hirsch, H. Wunsch, and J. Claassen. 2014. 'Continuous electroencephalography in a surgical intensive care unit', *Intensive Care Med*, 40: 228-34.
- Lagu, T., M. B. Rothberg, M. S. Shieh, P. S. Pekow, J. S. Steingrub, and P. K. Lindenauer. 2012. 'Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007', *Crit Care Med*, 40: 754-61.
- Lemay, A. C., A. Anzueto, M. I. Restrepo, and E. M. Mortensen. 2014. 'Predictors of long-term mortality after severe sepsis in the elderly', *Am J Med Sci*, 347: 282-8.
- Levy, M. M., M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent, G. Ramsay, and Conference International Sepsis Definitions. 2003. '2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference', *Intensive Care Med*, 29: 530-8.
- Lossinsky, A. S., and R. R. Shivers. 2004. 'Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review', *Histol Histopathol*, 19: 535-64.
- Louveau, A., I. Smirnov, T. J. Keyes, J. D. Eccles, S. J. Rouhani, J. D. Peske, N. C. Derecki, D. Castle, J. W. Mandell, K. S. Lee, T. H. Harris, and J. Kipnis. 2015. 'Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels', *Nature*, 523: 337-41.
- Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss. 2003. 'The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000', *N Engl J Med*, 348: 1546-54.
- Mazeraud, A., Q. Pascal, F. Verdonk, N. Heming, F. Chretien, and T. Sharshar. 2016. 'Neuroanatomy and Physiology of Brain Dysfunction in Sepsis', *Clin Chest Med*, 37: 333-45.

- Morandi, A., B. P. Rogers, M. L. Gunther, K. Merkle, P. Pandharipande, T. D. Girard, J. C. Jackson, J. Thompson, A. K. Shintani, S. Geevarghese, R. R. Miller, 3rd, A. Canonico, C. J. Cannistraci, J. C. Gore, E. W. Ely, R. O. Hopkins, and VISualizing Icu SurvivOrs Neuroradiological Sequelae Visions Investigation. 2012. '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*, 40: 2182-9.
- Mravec, B. 2010. 'The role of the vagus nerve in stroke', *Auton Neurosci*, 158: 8-12.
- Nguyen, D. N., H. Spapen, F. Su, J. Schiettecatte, L. Shi, S. Hachimi-Idrissi, and L. Huyghens. 2006. 'Elevated serum levels of S-100beta protein and neuron-specific enolase are associated with brain injury in patients with severe sepsis and septic shock', *Crit Care Med*, 34: 1967-74.
- Oddo, M., E. Carrera, J. Claassen, S. A. Mayer, and L. J. Hirsch. 2009. 'Continuous electroencephalography in the medical intensive care unit', *Crit Care Med*, 37: 2051-6.
- Ouimet, S., R. Riker, N. Bergeron, M. Cossette, B. Kavanagh, and Y. Skrobik. 2007. 'Subsyndromal delirium in the ICU: evidence for a disease spectrum', *Intensive Care Med*, 33: 1007-13.
- Pandharipande, P. P., T. D. Girard, J. C. Jackson, A. Morandi, J. L. Thompson, B. T. Pun, N. E. Brummel, C. G. Hughes, E. E. Vasilevskis, A. K. Shintani, K. G. Moons, S. K. Geevarghese, A. Canonico, R. O. Hopkins, G. R. Bernard, R. S. Dittus, E. W. Ely, and Brain-Icu Study Investigators. 2013. 'Long-term cognitive impairment after critical illness', *N Engl J Med*, 369: 1306-16.
- Patel, S. B., J. T. Poston, A. Pohlman, J. B. Hall, and J. P. Kress. 2014. 'Rapidly reversible, sedation-related delirium versus persistent delirium in the intensive care unit', *Am J Respir Crit Care Med*, 189: 658-65.

- Pfister, D., M. Siegemund, S. Dell-Kuster, P. Smielewski, S. Ruegg, S. P. Strebel, S. C. Marsch, H. Pargger, and L. A. Steiner. 2008. 'Cerebral perfusion in sepsis-associated delirium', *Crit Care*, 12: R63.
- Piazza, O., S. Cotena, E. De Robertis, F. Caranci, and R. Tufano. 2009. 'Sepsis associated encephalopathy studied by MRI and cerebral spinal fluid S100B measurement', *Neurochem Res*, 34: 1289-92.
- Pierrakos, C., R. Attou, L. Decorte, A. Kolyviras, S. Malinverni, P. Gottignies, J. Devriendt, and D. De Bels. 2014. 'Transcranial Doppler to assess sepsis-associated encephalopathy in critically ill patients', *BMC Anesthesiol*, 14: 45.
- Polito, A., F. Eischwald, A. L. Maho, A. Polito, E. Azabou, D. Annane, F. Chretien, R. D. Stevens, R. Carlier, and T. Sharshar. 2013. 'Pattern of brain injury in the acute setting of human septic shock', *Crit Care*, 17: R204.
- Popp, J. 2013. 'Delirium and cognitive decline: more than a coincidence', *Curr Opin Neurol*, 26: 634-9.
- Rangel-Frausto, M. S., D. Pittet, M. Costigan, T. Hwang, C. S. Davis, and R. P. Wenzel. 1995. 'The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study', *JAMA*, 273: 117-23.
- Reis, P. A., P. C. Alexandre, J. C. D'Avila, L. D. Siqueira, B. Antunes, V. Estado, E. V. Tibirica, F. Verdonk, T. Sharshar, F. Chretien, H. C. Castro-Faria-Neto, and F. A. Bozza. 2016. 'Statins prevent cognitive impairment after sepsis by reverting neuroinflammation, and microcirculatory/endothelial dysfunction', *Brain Behav Immun*.
- Rothenhausler, H. B., S. Ehrentraut, C. Stoll, G. Schelling, and H. P. Kapfhammer. 2001. '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', *Gen Hosp Psychiatry*, 23: 90-6.

- Sales Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS. 2006. 'Sepse Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras.', *Rev Bras Ter Intensiva*, 18: 9-17.
- Schramm, P., K. U. Klein, L. Falkenberg, M. Berres, D. Closhen, K. J. Werhahn, M. David, C. Werner, and K. Engelhard. 2012. 'Impaired cerebrovascular autoregulation in patients with severe sepsis and sepsis-associated delirium', *Crit Care*, 16: R181.
- Semmler, A., C. N. Widmann, T. Okulla, H. Urbach, M. Kaiser, G. Widman, F. Mormann, J. Weide, K. Fliessbach, A. Hoeft, F. Jessen, C. Putensen, and M. T. Heneka. 2013. 'Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84: 62-9.
- Shah, F. A., F. Pike, K. Alvarez, D. Angus, A. B. Newman, O. Lopez, J. Tate, V. Kapur, A. Wilsdon, J. A. Krishnan, N. Hansel, D. Au, M. Avdalovic, V. S. Fan, R. G. Barr, and S. Yende. 2013. 'Bidirectional relationship between cognitive function and pneumonia', *Am J Respir Crit Care Med*, 188: 586-92.
- Sharshar, T., D. Annane, G. L. de la Grandmaison, J. P. Brouland, N. S. Hopkinson, and G. Francoise. 2004. 'The neuropathology of septic shock', *Brain Pathol*, 14: 21-33.
- Sharshar, T., S. Bastuji-Garin, A. Polito, B. De Jonghe, R. D. Stevens, V. Maxime, P. Rodriguez, C. Cerf, H. Outin, P. Touraine, K. Laborde, and Reanimation Groupe de Reflexion et d'Etude des Neuromyopathies En. 2011. 'Hormonal status in protracted critical illness and in-hospital mortality', *Crit Care*, 15: R47.
- Sharshar, T., R. Carlier, F. Bernard, C. Guidoux, J. P. Brouland, O. Nardi, G. L. de la Grandmaison, J. Aboab, F. Gray, D. Menon, and D. Annane. 2007. 'Brain lesions in septic shock: a magnetic resonance imaging study', *Intensive Care Med*, 33: 798-806.

- Sharshar, T., R. Porcher, S. Siami, B. Rohaut, J. Bailly-Salin, N. S. Hopkinson, B. Clair, C. Guidoux, E. Iacobone, R. Sonnevile, A. Polito, J. Aboab, S. Gaudry, O. Morla, G. Amouyal, J. Azuar, J. Allary, A. Vieillard-Baron, M. Wolff, A. Cariou, D. Annane, and Sedation Paris-Ouest Study Group on Neurological Effect of. 2011. 'Brainstem responses can predict death and delirium in sedated patients in intensive care unit', *Crit Care Med*, 39: 1960-7.
- Silva, E., A. Pedro Mde, A. C. Sogayar, T. Mohovic, C. L. Silva, M. Janiszewski, R. G. Cal, E. F. de Sousa, T. P. Abe, J. de Andrade, J. D. de Matos, E. Rezende, M. Assuncao, A. Avezum, P. C. Rocha, G. F. de Matos, A. M. Bento, A. D. Correa, P. C. Vieira, E. Knobel, and Study Brazilian Sepsis Epidemiological. 2004. 'Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study)', *Crit Care*, 8: R251-60.
- Singer, M., C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J. D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J. L. Vincent, and D. C. Angus. 2016. 'The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)', *JAMA*, 315: 801-10.
- Sprung, C. L., P. N. Peduzzi, C. H. Shatney, R. M. Schein, M. F. Wilson, J. N. Sheagren, and L. B. Hinshaw. 1990. 'Impact of encephalopathy on mortality in the sepsis syndrome. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group', *Crit Care Med*, 18: 801-6.
- Streit, W. J., S. A. Walter, and N. A. Pennell. 1999. 'Reactive microgliosis', *Prog Neurobiol*, 57: 563-81.
- Synek, V. M. 1988a. 'EEG abnormality grades and subdivisions of prognostic importance in traumatic and anoxic coma in adults', *Clin Electroencephalogr*, 19: 160-6.
- Synek, V. M. 1988b. 'Prognostically important EEG coma patterns in diffuse anoxic and traumatic encephalopathies in adults', *J Clin Neurophysiol*, 5: 161-74.

- Taccone, F. S., D. Castanares-Zapatero, D. Peres-Bota, J. L. Vincent, J. Berre, and C. Melot. 2010. 'Cerebral autoregulation is influenced by carbon dioxide levels in patients with septic shock', *Neurocrit Care*, 12: 35-42.
- Taccone, F. S., F. Su, C. De Deyne, A. Abdellhai, C. Pierrakos, X. He, K. Donadello, O. Dewitte, J. L. Vincent, and D. De Backer. 2014. 'Sepsis is associated with altered cerebral microcirculation and tissue hypoxia in experimental peritonitis', *Crit Care Med*, 42: e114-22.
- Taccone, F. S., F. Su, C. Pierrakos, X. He, S. James, O. Dewitte, J. L. Vincent, and D. De Backer. 2010. 'Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study', *Crit Care*, 14: R140.
- Tracey, K. J. 2002. 'The inflammatory reflex', *Nature*, 420: 853-9.
- Tsuruta, R., and Y. Oda. 2016. 'A clinical perspective of sepsis-associated delirium', *J Intensive Care*, 4: 18.
- van Gool, W. A., D. van de Beek, and P. Eikelenboom. 2010. 'Systemic infection and delirium: when cytokines and acetylcholine collide', *Lancet*, 375: 773-5.
- Wang, H. E., N. I. Shapiro, D. C. Angus, and D. M. Yealy. 2007. 'National estimates of severe sepsis in United States emergency departments', *Crit Care Med*, 35: 1928-36.
- Watanabe, A., T. Sasaki, T. Yukami, H. Kanki, M. Sakaguchi, H. Takemori, K. Kitagawa, and H. Mochizuki. 2016. 'Serine racemase inhibition induces nitric oxide-mediated neurovascular protection during cerebral ischemia', *Neuroscience*, 339: 139-49.
- Weiss, N., F. Miller, S. Cazaubon, and P. O. Couraud. 2009. 'The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases', *Biochim Biophys Acta*, 1788: 842-57.

- Wilson, J. X., and M. Dragan. 2005. 'Sepsis inhibits recycling and glutamate-stimulated export of ascorbate by astrocytes', *Free Radic Biol Med*, 39: 990-8.
- Winters, B. D., M. Eberlein, J. Leung, D. M. Needham, P. J. Pronovost, and J. E. Sevransky. 2010. 'Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review', *Crit Care Med*, 38: 1276-83.
- Wolters, A. E., D. van Dijk, W. Pasma, O. L. Cremer, M. F. Looije, D. W. de Lange, D. S. Veldhuijzen, and A. J. Slooter. 2014. 'Long-term outcome of delirium during intensive care unit stay in survivors of critical illness: a prospective cohort study', *Crit Care*, 18: R125.
- Young, G. B., C. F. Bolton, Y. M. Archibald, T. W. Austin, and G. A. Wells. 1992. 'The electroencephalogram in sepsis-associated encephalopathy', *J Clin Neurophysiol*, 9: 145-52.

ANEXO 1: CEUA2011/11

**INSTITUTO SÍRIO-LIBANÊS
DE ENSINO E PESQUISA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
HOSPITAL SÍRIO-LIBANÊS**

REGISTRO CEUA: CEUA2011/11

COORDENADOR: Dr. Luciano Cesar Pontes de Azevedo

**TÍTULO DO PROJETO: Fisiopatologia da encefalopatia associada a sepse:
avaliação com monitorização multimodal e estudo da função mitocondrial**

Prezado Coordenador,

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ensino de Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês analisou e **APROVOU COM PEQUENAS MODIFICAÇÕES** em **09 de maio de 2011** a realização do projeto de pesquisa.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES:

Comunicar alterações no projeto.

São Paulo, 09 de maio de 2011.

Dra. Camila Squarzoni Dale
Vice Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Hospital Sírio-Libanês

ANEXO 2: CEP – CAAE 19752613.9.1001.5249

HOSPITAL COPA DOR


PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: SAE Study - Avaliação da disfunção cerebral em pacientes com sepse grave: Estudo observacional

Pesquisador: Fernando Augusto Bozza

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 19752613.9.1001.5249

Instituição Proponente: INSTITUTO D'OR DE PESQUISA E ENSINO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 521.030

Data da Relatoria: 10/12/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma modificação de um projeto já aprovado pelo CEP em setembro de 2013 (parecer:404.802) no qual os autores solicitam autorização de um estudo piloto com 20 pacientes antes da execução do projeto maior.

Não houve mudanças nas características dos pacientes ou no desenvolvimento do estudo.

Estudo piloto aprovado em reunião ordinária do CEP em 16 de janeiro de 2014

Objetivo da Pesquisa:

vide parecer numero 404.802 de 24 set. de 2013

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

vide parecer numero 404.802 de 24 set. de 2013

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

vide parecer numero 404.802 de 24 set. de 2013

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

vide parecer numero 404.802 de 24 set. de 2013

Endereço: Rua Figueiredo Magalhães, 875

Bairro: Copacabana

CEP: 22.031-010

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2545-3792

Fax: (21)2548-6610

E-mail: cepcopador@copador.com.br

ANEXO 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: **SAE Study - Avaliação da disfunção cerebral aguda em pacientes com sepse grave: Estudo Observacional**

Justificativa do estudo : O motivo que nos levou a estudar esse problema deve-se ao fato de que a sepse (conhecida também como septicemia, doença que surge quando germes, principalmente bactérias, invadem a corrente sanguínea e provocam uma intensa resposta inflamatória por todo o organismo) pode levar a uma alteração da função cerebral aguda em pacientes internados em terapia intensiva. Estudos recentes sugerem que a sepse também tem relação com comprometimento cognitivo de longo prazo (atenção, percepção, raciocínio entre outros) e alterações funcionais. Apesar da sua importância a disfunção cerebral aguda é com frequência subdiagnosticada, um dos principais motivos para isso é a falta de critérios diagnósticos precisos.

Objetivo do estudo: Definir a frequência e fatores de risco associados ao desenvolvimento de disfunção cerebral aguda assim como a disfunção cognitiva de longo prazo.

Proposta do Estudo: O Sr(a) _____ está sendo convidado (a) a participar deste estudo, que busca definir a frequência e fatores de risco associados ao desenvolvimento de disfunção cerebral aguda assim como a disfunção cognitiva de longo prazo.

Explicação dos procedimentos

Exames Laboratoriais

Na sua internação será realizada coleta de 5mL de sangue (uma colher de chá) em até 5 tempos: 1, 3, 5, 7 e 14 dias de internação para análise de biomarcadores, que em geral são substâncias que indicam um estado biológico, um estado de doença particular ou a presença de infecção por exemplo. A coleta será realizada utilizando material estéril e descartável. Este procedimento é semelhante a coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina.

Eletroencefalograma (EEG)

Durante as primeiras 48 horas de sua internação será realizado um EEG. Trata-se de um exame que analisa a atividade elétrica cerebral espontânea, captada através da utilização de eletrodos colocados sobre o couro cabeludo. Uma variedade de doenças psiquiátricas e neurológicas pode ser detectada com o eletroencefalograma, tanto as degenerativas quanto as infecciosas. O eletroencefalograma é um procedimento seguro que não gera efeitos colaterais. Pode ser realizado em crianças e adultos e não provoca dor alguma.

Entrevistas

Durante a sua internação será realizado contato com o seu familiar sendo aplicados questionários a fim de avaliar sua atividade cognitiva (atenção, percepção, memória, raciocínio entre outros) até o momento da internação.

Posteriormente, nos períodos de 28, 90, 180 e 360 dias esses questionários serão novamente aplicados para verificar se houve alguma alteração no período.

Avaliação presencial

Será solicitado o seu comparecimento para avaliação presencial em dois momentos: 90 e 180 dias, para aplicação de testes cognitivos com psicólogos a fim de avaliar a manutenção da sua atividade cognitiva (atenção, percepção, memória, raciocínio entre outros).

Benefícios: O benefício de sua participação no estudo será uma profunda avaliação de sua atividade cognitiva após sua internação em unidade de terapia intensiva com equipe de saúde incluindo médicos e psicólogos.

Além disso, este estudo ajudará a compreender os fatores de risco associados a disfunção cerebral aguda e disfunção cognitiva em longo prazo, contribuindo para intervenções futuras em pacientes com esses critérios clínicos.

Desconforto e Riscos: Os desconfortos que podem ocorrer são aqueles relacionados a uma retirada normal de sangue para exame, como dor e formação de um hematoma local.

Para o exame de eletroencefalograma, durante as provas de ativação, alguns pacientes podem, por ventura, enfrentar crises epiléticas. Entretanto, a unidade hospitalar dará todo o suporte médico e farmacológico para estes casos. .

Este estudo não implica em riscos, nem em qualquer modificação do tratamento empregado ou administração de medicamentos experimentais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

Participação Voluntária no Estudo: A participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar, bem como cancelar sua participação a qualquer momento do estudo. Esta decisão não afetará de nenhuma maneira os cuidados médicos que lhe serão oferecidos.

Confidencialidade: Seu prontuário médico poderá ser consultado pelos profissionais envolvidos no estudo. Entretanto, o seu nome não será mencionado em publicações ou relatórios produzidos para este estudo. Será garantido a manutenção do sigilo e da privacidade dos participantes da pesquisa durante todas as fases da mesma.

Armazenamento de amostras: As amostras serão armazenadas no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz (Pavilhão Haity Moussatché)/FIOCRUZ para a realização das análises. Se no futuro houver necessidade da dosagem de outras substâncias nestas amostras de soro/plasma, o paciente ou responsáveis serão contactados para nova avaliação e autorização para uso deste material.

Custos de Participação: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

Forma de Acompanhamento e Assistência: Todos os pacientes serão acompanhados no decorrer do estudo através de contato telefônico no período de 28, 90, 180 e 360 dias, e avaliação presencial nos períodos de 90 e 180 dias.

Consentimento para a Participação no Estudo:

A sua assinatura significa que você leu este formulário, ou que ele foi lido para você, que lhe foram dadas todas as explicações sobre o estudo, que você recebeu respostas para as suas dúvidas, está satisfeito com as informações que lhe foram dadas e concordou com a participação no estudo.

Eu, _____ fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O(a) enfermeiro(a) de pesquisa deste projeto _____ me certificou de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dúvidas poderei chamar o(a) Coordenador(a) do Estudo _____, os pesquisadores responsáveis Fernando Augusto Bozza e Jorge Ibrain Salluh no telefone (21) 2538-3541 ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto D'Or de Ensino e Pesquisa, sito à Rua Diniz Cordeiro, 30 – Botafogo – Rio de Janeiro – RJ – Brasil.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

SE O PACIENTE NÃO É CAPAZ DE CONSENTIR:

A sua assinatura, como representante legal do paciente, significa que você leu este formulário, ou que ele foi lido para você, que lhe foram dadas todas as explicações sobre o estudo, que você recebeu respostas para as suas dúvidas, está satisfeito com as informações que lhe foram dadas e concordou com a participação do paciente no estudo.

_____ não é capaz de dar o seu consentimento.

Nome do Representante Legal	Grau de parentesco com o paciente
-----------------------------	-----------------------------------

Nome

Assinatura do Responsável

Data

Nome

Assinatura do Pesquisador

Data