

JÚLIA MARIA PEIXOTO LOUREIRO

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM VITAMINA E NA
SEPSE EXPERIMENTAL E SUA SEQUELA AVERSIVA



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO

2020

Trabalho realizado no Laboratório de Imunofarmacologia, do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, sob a orientação de Patricia Alves Reis e coorientação de Tamires da Cunha Fernandes.

Loureiro, Júlia Maria Peixoto

Efeito do tratamento com Vitamina E na sepse experimental e sua seqüela cognitiva / Júlia Maria Peixoto Loureiro. – Rio de Janeiro: UFRJ, 2020.

xi; 78 f.: il ; 30cm

Orientador: Patricia Alves Reis

Coorientador: Tamires da Cunha Fernandes

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2020.

Bibliografia: f.67-78

1. Sepse 2. Inflamação 3. Sistema imune 4. Vitamina E I. Reis, Patricia Alves II. Fernandes, Tamires da Cunha III. UFRJ. Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. IV. Título

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: Júlia Maria Peixoto Loureiro
 DRE: 117155760

BANCA EXAMINADORA: Profa. Renata Meirelles Pereira (Presidente)
 Dr^a. Livia Teixeira
 Prof. Pablo Trindade
 Prof. Marcelo Bozza (Suplente)

Título da Monografia: “Efeito do tratamento com vitamina E na sepse experimental e sua sequela cognitiva”

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/idd-zeym-igw>.
 Data e hora de início: **12 de novembro de 2020 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.


Rio de Janeiro, 12 de Novembro de 2020.

NOTA	Banca Examinadora:
10	Profa. Renata Meirelles Pereira
10	Dr ^a . Livia Teixeira
10	Prof. Pablo Trindade
_____	Prof. Marcelo Bozza

Presidente da banca: 
 Prof. Renata Meirelles Pereira

Aluno: Júlia Maria Peixoto Loureiro
 Júlia Maria Peixoto Loureiro

Orientador: Patricia Alves Reis
 Dr^a. Patricia Alves Reis (MSc. Tamires da Cunha Fernandes – Coorientador)

Coordenador de TCC: 
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico este trabalho à minha família e ao meu noivo, que me apoiaram incondicionalmente durante todos os momentos da minha vida acadêmica.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente à Deus, que me sustentou todos os dias, e a quem sou grata por absolutamente tudo que acontece na minha vida, sem Ele, eu nada seria e nada teria conquistado;

Aos meus pais, Vitor Loureiro e Débora Monteiro, que embarcaram comigo em mais uma aventura, que sempre me apoiaram e que fizeram o impossível para que eu tivesse uma educação de qualidade, que são meus exemplos de fé, de integridade e de comprometimento. O objetivo da minha vida é orgulhar vocês, espero estar chegando lá;

Aos melhores irmãos do mundo, Luiza Maria e João Vitor, que estiveram sempre comigo, de perto ou de longe, nos melhores e piores momentos, provocando meus sorrisos mais sinceros e trazendo alegria e motivação para os meus dias de tristeza e de desesperança;

À minha tia, Vivian Loureiro, por ser mais que uma tia, e desempenhar a função de uma grande amiga, quase irmã, que sempre esteve disposta a me ajudar e me defender de tudo e de todos, você é um exemplo enorme para mim e para minha carreira;

Às minhas avós, Gleide e Ercília, que nunca economizaram nas orações, que se preocupavam com a minha segurança e principalmente com minha alimentação durante esses 4 anos, obrigada por terem sempre uma palavra de conforto e um almoço delicioso;

Ao meu noivo, Gabriel Ourique, que ouviu pacientemente todas as minhas angústias e tinha sempre uma palavra de ânimo para me dar, que passou noites em claro me ouvindo ensaiar, que me aplaudia de pé a cada conquista, que se tornou meu fã número 1, obrigada pelo companheirismo de todos os dias;

À minha orientadora, Dr^a Patricia Reis, pela chance que me deu ao me aceitar no seu grupo, pela oportunidade de desenvolver esse projeto, por todo apoio, dedicação, disponibilidade e paciência ao me orientar. Obrigada por ser inspiração como professora e pesquisadora para mim, que estou apenas ingressando no universo científico;

À minha co-orientadora, M.a Tamires Fernandes, por todos os ensinamentos, pelas horas de experimento que passavam mais rápido com a sua presença, por ser sempre tão gentil e dedicada a me ajudar em qualquer situação e principalmente pela linda amizade que criamos;

Ao meu grupo, em especial Tathiany Igreja, Millena Pais e Emílio Telles, pelo apoio e amizade, pela descontração de sempre e por incentivarem meu desenvolvimento pessoal e profissional;

A todos os membros do Laboratório de Imunofarmacologia, pela ótima recepção, pelos momentos divertidos e todo conhecimento compartilhado;

À Dr^a Renata Meirelles, por todas as aulas de Imunologia, que me deixavam fascinada e com mais anseio de aprender, por aceitar ser minha tutora de estágio desde o 3º período, sempre muito solícita, por acompanhar ativamente o desenvolvimento do meu projeto e por aceitar o convite para compor a Banca Examinadora do meu PTCC e TCC;

À Dr^a Livia Teixeira, por todas as considerações pertinentes e pela gentileza de aceitar sem hesitação o convite para constituir a Banca Examinadora do meu PTCC e TCC;

Ao Dr Pablo Trindade, por aceitar de imediato o convite para constituir a Banca Examinadora deste trabalho;

Ao Dr Marcelo Bozza, por aceitar tão prontamente o convite de compor a Banca Examinadora como suplente;

Aos demais amigos, em especial meu grupo “Dano Cognitivo”, Rafaela, Felipe, Gabriel e Talita, pelo apoio imensurável, pelas noites de estudo, pelas revisões pré-provas no Bandeirão e nos corredores do CCS, pelas conversas infinitas no WhatsApp, mesmo em tempos de EAD, sem vocês esses 4 anos teriam durado uma eternidade. Obrigada pela grande amizade, que vai perdurar por toda minha vida;

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e a Universidade Federal do Rio de Janeiro, por terem se tornado minha casa durante esse tempo;

Ao Instituto Oswaldo Cruz, bem como todas as formas de fomento, que tornaram possível a realização deste trabalho.

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante.”

(O Pequeno Príncipe, Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

JÚLIA MARIA PEIXOTO LOUREIRO

EFEITO DO TRATAMENTO COM VITAMINA E NA SEPSE EXPERIMENTAL E SUA SEQUELA COGNITIVA

Orientador: Patricia Alves Reis

Coorientador: Tamires da Cunha Fernandes

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Introdução: A sepse consiste na disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma complexa interação entre hospedeiro e agentes infecciosos, sendo caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica desregulada do hospedeiro à uma infecção. A encefalopatia associada a sepse (EAS) é frequentemente uma das primeiras manifestações clínicas da sepse e um dos maiores problemas desse quadro é a deficiência de terapias efetivas, pois os meios utilizados para o tratamento são antibióticos e medidas paliativas, que muitas vezes não impedem a mortalidade ou mesmo o desenvolvimento de sequelas. A inflamação sistêmica resulta no processo de neuroinflamação, que pode contribuir para o desenvolvimento do dano cognitivo associado à EAS. Nesse cenário, o potencial de substâncias anti-inflamatórias e moduladoras da resposta imune deve ser explorado com urgência. Este trabalho tem como objetivo avaliar o uso do tratamento adjuvante de vitamina E como estratégia terapêutica para a prevenção do desenvolvimento de sequelas cognitivas associadas a EAS experimental.

Métodos e Resultados: A sepse experimental foi conduzida em camundongos Swiss Webster machos (CEUA L005/20), divididos em dois grupos: CLP, grupo que recebeu veículo (DMSO 1%, 200 µl, v.o) e CLP + Vit E, tratado com vitamina E (100 mg/kg) por via oral 1 hora antes da indução da sepse e, a seguir, 6, 24 e 48 horas após o CLP, juntamente com antibioticoterapia. Um grupo controle foi falso operado (SHAM). O tratamento com Vit E foi capaz de alterar o desenvolvimento da sepse, uma vez que a análise do escore clínico realizada 24h pós-CLP mostrou que o grupo CLP + Vit E desenvolveu um nível mais brando da doença. O tratamento aumentou a taxa de sobrevivência dos animais até 96h pós-CLP. O tratamento com Vit E foi capaz de aumentar significativamente os níveis de IL-10 no soro e tecido cerebral 6h pós-CLP e reduzir significativamente a produção de TNF- α no tecido cerebral 6h pós-CLP. Os níveis séricos de S100 β 6h pós-CLP aumentaram no grupo CLP e foram reduzidos pelo tratamento com Vit E, sugerindo uma diminuição na ativação de astrócitos, células que quando ativadas desempenham um papel importante no desenvolvimento da neuroinflamação. A administração de Vit E reduziu os níveis de 3-Nitrotirosina e 4-HNE no tecido cerebral 6h pós-CLP, moléculas descritas como marcadores de estresse oxidativo. Além disso, a administração de Vit E preveniu a formação do dano cognitivo em camundongos, conforme evidenciado pelo teste comportamental de memória aversiva *Freezing*, realizado no 15º dia pós-CLP. **Conclusão:** O tratamento adjuvante de vitamina E desempenha um papel promissor na retenção e prevenção de danos causados pela resposta inflamatória exacerbada e sequelas cognitivas decorrentes do EAS.

Palavras-chave: Sepse, inflamação, sistema imune, Vitamina E.

ABSTRACT

JÚLIA MARIA PEIXOTO LOUREIRO

EFFECT OF VITAMIN E TREATMENT IN EXPERIMENTAL SEPSIS AND ITS COGNITIVE SEQUEL

Orientador: Patricia Alves Reis
Coorientador: Tamires da Cunha Fernandes

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Introduction: Sepsis consists of the potentially fatal organ dysfunction, caused by a complex interaction between host and infectious agents, being characterized by a host's unregulated systemic inflammatory response to an infection. Sepsis-associated encephalopathy (EAS) is often one of the first clinical manifestations of sepsis and one of the biggest problems of this condition is the lack of effective therapies since the means used for treatment are antibiotics and palliative measures, which often do not prevent mortality or even the development of sequelae. Systemic inflammation results in the process of neuroinflammation, which can contribute to the development of cognitive damage associated with EAS. In this scenario, the potential of anti-inflammatory and immune response modulating substances must be explored urgently. This work aims to evaluate the use of adjuvant vitamin E treatment as a therapeutic strategy for the prevention of the development of cognitive sequelae associated with experimental EAS. **Methods and Results:** The experimental sepsis was carried out in male Swiss Webster mice (CEUA L005/20), divided into two groups: CLP, group that received vehicle (DMSO 1%, 200 μ l) and CLP + Vit E, treated with vitamin E (100 mg/kg) orally 1 hour before sepsis induction and then 6, 24 and 48 hours after CLP, together with antibiotic therapy. A control group was false operated (SHAM). Treatment with Vit E was able to alter the development of sepsis since the analysis of the clinical score performed 24 hours after CLP showed that the CLP + Vit E group developed a milder level of the disease. The treatment increased the animals' survival rate up to 96h post-CLP. Treatment with Vit E was able to significantly increase the levels of IL-10 in serum and brain tissue 6h post-CLP and significantly reduce the production of TNF- α in brain tissue 6h post-CLP. Serum S100 β 6h post-CLP levels increased in the CLP group and were reduced by treatment with Vit E, suggesting a decrease in the activation of astrocytes, cells that when activated play an important role in the development of neuroinflammation. The administration of Vit E reduced the levels of 3-Nitrotyrosine and 4-HNE in brain tissue 6h post-CLP, molecules described as markers of oxidative stress. Additionally, Vit E administration prevented the formation of cognitive damage in mice, as evidenced by the *Freezing* behavioral aversive memory test, performed on the 15th day after CLP. **Conclusion:** The adjuvant treatment of vitamin E plays a promising role in the retention and prevention of damage caused by the exacerbated inflammatory response and cognitive sequelae resulting from EAS.

Key-words: Sepsis, inflammation, immune system, Vitamin E.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCP - *American College of Chest Physicians*

AMPA - α - amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic fator*)

BCA - Ácido bicinconínico (*Bicinchoninic acid*)

BHE - Barreira hematoencefálica

CAMKII - Cálcio-calmodulina quinase II

CLP - Sepse por Ligadura e Punção Cecal (*Cecal ligation puncture model of sepsis*)

DAMPs - Padrões moleculares associados ao dano (*damage-associated molecular patterns*)

DA - Doença de Alzheimer

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DP - Doença de Parkinson

EAS - Encefalopatia associada a sepse

ELA - Esclerose Lateral Amiotrófica

ERON - Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

ESICM - *European Society of Intensive Care Medicine*

FT - Fator Tecidual

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule 1*)

IL- Interleucina

ILAS - Instituto Latino Americano para Estudos da Sepse

LPS - Lipopolissacarídeo de bactérias

LTP - Potenciação de longa duração (*long-term potenciacion*)

NMDA - N-Methyl-D aspartate

NO - Óxido nítrico (*Nitric Oxide*)

NOS - Óxido nítrico sintase

PAM - Pressão arterial média

PAMPs - Padrões moleculares associados à patógeno (*Pathogen-associated molecular patterns*)

PK - Proteína quinase (*Protein kinase*)

PAS - Pressão arterial sistólica

PROGRESS - *Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis*

RNS - Espécies reativas de nitrogênio (*Reactive nitrogen species*)

RNA - Ácido Ribonucleico

ROS - Espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*)

RRP - Receptores de reconhecimento padrão

SIRS - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

SNC - Sistema nervoso central

SCCM - *Society Critical Care Medicine*

SUS - Sistema Único de Saúde

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α (*Tumor necrosis factor α*)

TRL - Receptores semelhantes ao Toll (*Toll-like receptors*)

UTI - Unidade de terapia intensiva

3-Nitro - Nitrotirosina

4-HNE - 4-hidroxi-2-nonenal

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
1. Introdução.....	15
1.1 Sepses.....	15
1.1.1 Origem e Definição	15
1.1.2 Epidemiologia	17
1.1.3 Sintomatologia e Tratamento	21
1.2 Fisiopatologia	25
1.3 Estresse Oxidativo.....	31
1.4 Encefalopatia associada a sepsis e neuroinflamação	33
1.5 Dano Cognitivo	36
1.6 Vitamina E.....	41
1.7 Modelos experimentais de sepsis	43
2. Justificativa	46
3. Objetivos	47
3.1 Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4. Materiais e Métodos	47
4.1 Modelo experimental de sepsis	47
4.2 Desenho experimental	48
4.3 Curva de sobrevivência e avaliação de escore clínico	49
4.4 Coleta de amostra.....	49
4.4.1 Sangue.....	49
4.4.2 Tecido cerebral	50
4.5 Dosagem de proteína (BCA).....	50
4.6 Ensaio de imun absorção ligado à enzima (ELISA)	50
4.7 Ensaio de Dot Blot	51
4.8 Avaliação cognitiva	52
4.8.1 <i>Freezing</i>	52
4.9 Análise estatística	52
5. Resultados	53
5.1 O tratamento prolongado com Vitamina E reduziu a mortalidade e alterou o escore clínico de animais submetidos a sepsis experimental	53
5.2 O tratamento com Vitamina E reduziu a produção de TNF- α em amostras de tecido cerebral 6 horas após a indução de sepsis experimental	55
5.3 O tratamento com Vitamina E interferiu nos níveis de IL-10 em amostras de soro e tecido cerebral 6 horas após a indução de sepsis experimental	56
5.4 A administração de Vitamina E não alterou os níveis de S100 β em amostras de soro 6 horas após a indução de sepsis experimental	58
5.5 O tratamento com Vitamina E reduziu a produção de 3-Nitrotirosina e 4-hidroxi-2-nonenal em amostras de tecido cerebral 6 horas após a indução de sepsis experimental	59

5.6 A administração de Vitamina E preveniu a formação do dano cognitivo em camundongos com sepse experimental induzida	61
6. Discussão	62
7. Conclusão	68
8. Referências Bibliográficas	69

1. Introdução

1.1 Sepsis

1.1.1 Origem e Definição

Em uma perspectiva histórica, a origem da palavra sepsis é grega, derivando de *sepsikós*, e significa “putrefação”, ou seja, deterioração dos tecidos e órgãos do corpo humano, e foi descrita pela primeira vez pelo médico da antiguidade Hipócrates, 400 anos a.C., considerado por muitos o “Pai da Medicina Ocidental”. Hipócrates se referia a sepsis afirmando que “Quando a febre é contínua, a superfície externa do corpo está fria, e existe internamente uma grande sensação de calor e sede, a afecção é mortal.” (ILAS, 2015, pp. 9; Oliveira, 2017).

No século XIX, os esforços dos cientistas Semmelweis, Pasteur e Lister geraram trabalhos muito relevantes para o esclarecimento de diversas patologias. Esses trabalhos, definiram por exemplo, que um processo infeccioso era causado por microrganismos vivos, dessa forma, a palavra sepsis começou a se associar à um tipo de infecção grave, invasiva e muito prejudicial (Cavalcanti, 2011).

Ao longo do tempo, muitas definições foram propostas, com o intuito de caracterizar a infecção grave da forma mais semelhante ao que acontecia na realidade. O conflito entre as diferentes nomenclaturas utilizadas, como infecção generalizada, septicemia e síndrome séptica, comprometeu o entendimento dos casos clínicos e estudos publicados, dificultando também a avaliação sobre os tratamentos usados, atrasando assim o avanço da assistência médica aos pacientes acometidos com a doença (Bone *et al.*, 1992). Portanto, existia uma grande necessidade de padronizar todas as nomenclaturas para identificar o quadro clínico dos pacientes. Para isso, em 1992, ocorreu a primeira reunião de consenso entre a *Society Critical Care Medicine* (SCCM) e o *American College of Chest Physicians* (ACCP), que gerou algumas definições padronizadas a respeito do quadro clínico, e foram publicadas em formato de artigo no mesmo ano.

Essas definições foram utilizadas por um tempo, mas eram duramente criticadas, uma vez que possuíam um teor de subjetividade e não permitiam um diagnóstico preciso. É possível perceber essa falta de especificidade ao comparar os critérios de classificação entre Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), sepse e sepse grave, pois a diferenciação entre os quadros, na maioria das vezes não é totalmente clara, já que dificilmente a infecção confirmada ou até mesmo suspeita é detectada, assim como nem sempre é possível identificar os sinais clássicos da SIRS em pacientes idosos ou imunossuprimidos, apesar da manifestação da disfunção orgânica. Logo, diferenciar esses conceitos na prática se torna um grande desafio (Levy *et al.*, 2003; Singer *et al.*, 2016).

Para solucionar os impasses destacados entre os termos escolhidos na primeira reunião de consenso sobre sepse em 1992, as mesmas sociedades realizaram outras conferências, com a finalidade de atualizar os conceitos definidos (Levy *et al.*, 2003).

Em 2016 foi publicado pela *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e a *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM), um artigo com novas definições apoiadas em uma grande análise de bancos de dados, principalmente americanos, e a partir desse estudo, houve uma mudança conceitual dos termos que eram utilizados até o momento. As definições estabelecidas em 2016 estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 – Definições de sepse e choque séptico conforme consenso de 2016. (Fonte: Instituto Latino Americano para Estudos da Sepse - ILAS)

Sepse	Disfunção orgânica potencialmente fatal secundária à uma resposta inadequada do hospedeiro a uma infecção. A disfunção orgânica é caracterizada pelo aumento em 2 pontos no escore <i>Sequential Organ Failure Assessment</i> (SOFA) como consequência da infecção.
Choque Séptico	Sepse associada ao estado de falência circulatória e celular/metabólica com a persistência de hipotensão arterial, apesar da reconstituição volêmica, com necessidade do uso de vasopressores para manter a pressão arterial média > 65 mmHg e lactato 2 mmol/L.

*Abreviações: mmHg (milímetros de mercúrio); mmol/L (milimol por litro).

Assim, a sepse passou a ser definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma complexa interação entre hospedeiro e agentes infecciosos, sendo

caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica desregulada do hospedeiro à uma infecção comprovada ou suspeita (ILAS, 2015, pp. 15-17; Singer *et al.*, 2016). O tipo de infecção que o indivíduo adquire e as consequências futuras são dependentes de fatores externos, como o agente etiológico causador da infecção, e de fatores inerentes ao hospedeiro, como idade, doenças subjacentes, lesões concomitantes, estado nutricional e perfil genético. Esses fatores, em conjunto, são responsáveis por aumentar a susceptibilidade de complicações do paciente (Cho e Choi, 2014; Singer *et al.*, 2016).

A alteração conceitual desse termo foi fundamental, pois definir sepse de acordo com os aspectos da SIRS, como contagem de glóbulos brancos, temperatura e frequência cardíaca, não eram suficientes para explicar todos os processos que ocorrem durante a sepse, esses parâmetros remetem apenas ao quadro inflamatório, e por isso não necessariamente indicam que há o desenvolvimento de uma resposta imune exacerbada com alto risco de mortalidade. Além disso, a expressão “sepse grave” deixou de existir, simplificando a nomenclatura, e o uso da palavra sepse tornou-se restrito para classificar os pacientes já acometidos com disfunção de órgãos (Vincent *et al.*, 2013; Hotchkiss *et al.*, 2016).

Os novos conceitos adotados a partir de 2016 trouxeram maior especificidade aos quadros clínicos provenientes da sepse e a resposta inflamatória desencadeada pela infecção, assim como o acréscimo de sinais e sintomas do quadro foram muito importantes para uma evolução no diagnóstico eficaz da doença (Cho e Choi, 2014; Singer *et al.*, 2016). Porém, alguns pesquisadores apontam que os critérios escolhidos pela SCCM e ESICM reduzem a sensibilidade do diagnóstico e selecionam apenas uma população de pacientes muito grave, o que não reflete a realidade dos pacientes presentes nos hospitais. Por isso, instituições renomadas, como o Instituto Latino Americano para Estudos da Sepse (ILAS), reforçam que apesar das definições e dos critérios de diagnóstico estabelecidos no documento de 2016, o esforço atual no combate a sepse deve se concentrar no diagnóstico precoce, não somente na detecção do estado avançado quando a disfunção orgânica já estiver presente, e na melhor percepção dos profissionais de saúde (ILAS, 2017, pp.17).

1.1.2 Epidemiologia

Os principais microrganismos causadores da sepse na comunidade são as bactérias, provenientes de infecções como pneumonia comunitária, infecções do trato gastrointestinal e do trato urinário, além das meningites. Nos casos de indivíduos já hospitalizados, os patógenos mais comuns são advindos de pneumonias associadas ao respirador e aspirações, infecções

relacionadas aos acessos venosos, suturas e abscessos. Na maior parte dos levantamentos epidemiológicos, a pneumonia é o foco infeccioso responsável por metade dos casos de sepse (ILAS, 2017, pp. 19). De acordo com o foco infeccioso, a manifestação da doença pode se apresentar de forma mais grave, por exemplo, estudos demonstram que os pacientes sépticos que manifestaram o quadro a partir de um foco infeccioso do trato urinário, possuem uma pequena taxa de mortalidade, pela menor gravidade no desenvolvimento da doença, quando comparado a outros focos. Devido as diversas dificuldades encontradas para diagnosticar corretamente a sepse, dificilmente os agentes etiológicos são identificados (Siddiqui, 2007; Sogayar *et al.*, 2008; Bellomo *et al.*, 2015).

Apesar do fato de que grande parte dos casos de sepse são provenientes de infecções bacterianas, fungos e vírus também podem ser os agentes etiológicos responsáveis pelo quadro séptico (Lepak e Andes, 2011; Shane e Stoll, 2013; Lin *et al.*, 2018). Neste ano de 2020, o mundo está enfrentando uma pandemia causada pelo vírus Sars-CoV-2, que já atingiu mais de 60 milhões de pessoas e, até o momento, foi responsável por mais de 1 milhão de mortes (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>, acessado em 26/11/2020 às 12:37h). Estudos demonstram que a doença causada por esse vírus, a Covid-19, é uma doença sistêmica, podendo atingir diversos órgãos do organismo e causar falência múltipla de órgãos (Li *et al.*, 2020; Shenoy, 2020). Além disso, já se sabe que um dos sistemas que pode ser atingido pela infecção viral é o SNC, e o indivíduo que tiver seu SNC afetado pela doença, apresenta sequelas cognitivas temporárias ou prolongadas. Sendo assim, a Covid-19 tem sido reconhecida como um tipo de sepse viral, caracterizando uma doença de alta gravidade que está associada a uma elevada taxa de mortalidade (Asadi-Pooya e Simani, 2020; Ferrando *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020).

A sepse é considerada uma das doenças com maior frequência mundial, além de ser uma patologia que acomete países desenvolvidos, em desenvolvimento e subdesenvolvidos, mas vale ressaltar que o número de casos também está associado a um caráter socioeconômico, possuindo uma alta incidência em diversos continentes (Figura 1). Por causa do aumento de sua incidência, que pode estar relacionada com a melhoria no diagnóstico, permitindo uma detecção maior de pacientes que sobrevivem ao insulto inicial, ou pelo aumento da população idosa e do número de indivíduos imunossuprimidos, a sepse se tornou um grande problema de saúde pública, pois atinge cerca de 50 milhões de pessoas anualmente, sendo responsável por uma estimativa de 11 milhões de óbitos por ano (Fleischmann *et al.*, 2015; Lobo *et al.*, 2019; Rudd *et al.*, 2020).

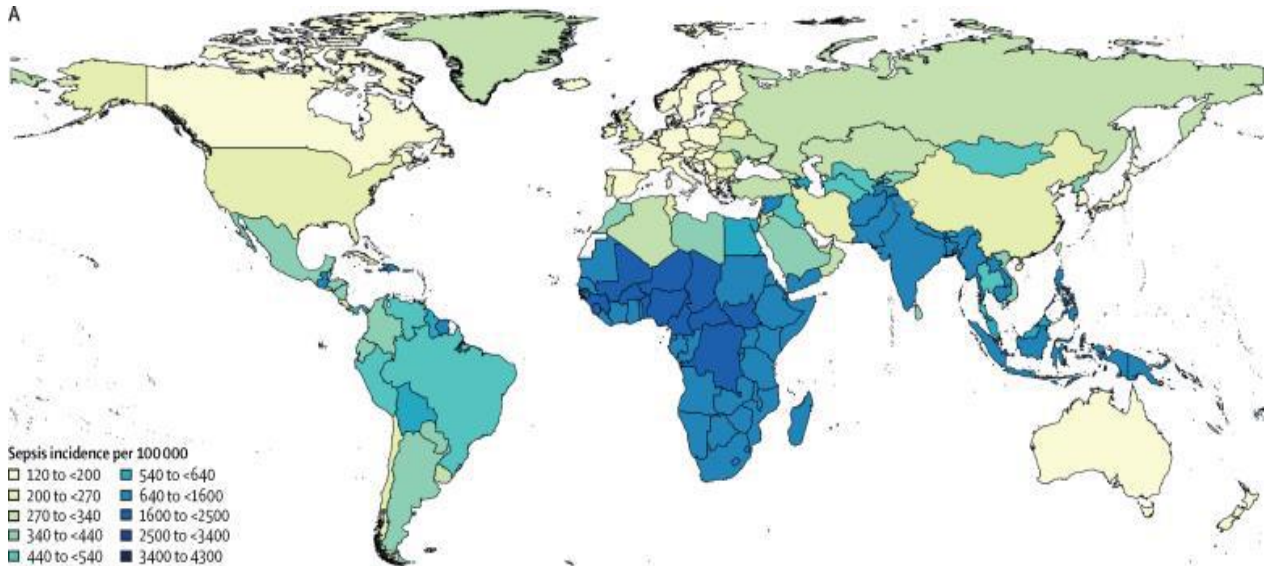


Figura 1. Incidência de sepse por 100.000 habitantes para ambos os sexos, em 2017. (Fonte: ADAPTADO de Rudd *et al.*, 2020).

Um fator que favorece o alto índice de mortalidade da sepse é a demora no diagnóstico e no início do tratamento. Outro ponto a ser destacado é que possivelmente esses números estejam subestimados, já que muitas vezes, a causa da morte do paciente é atribuída à uma patologia de base e não propriamente à sepse (Araújo, 2014).

Dados da literatura demonstram que o tratamento da sepse está listado como a condição mais cara nos hospitais dos Estados Unidos, e esse cenário se repete na maioria dos países do mundo, nos setores públicos e privados (ILAS, 2015, pp. 24). Estudos revelam que o custo mediano que um hospital tem por dia com um paciente séptico, é de US\$ 586, e o custo médio por estadia completa do paciente, varia entre US\$ 5.051 e US\$ 64.788. O alto custo para os hospitais ocorre devido à necessidade do uso de equipamentos sofisticados, muitos medicamentos e por exigir uma equipe numerosa de suporte ao paciente. Além disso, a sepse geralmente é acompanhada de comorbidades secundárias, como por exemplo a pneumonia (ILAS, 2015, pp. 17). Apesar desses fatores, a doença ainda é classificada como pouco conhecida tanto pelos profissionais de saúde como pela sociedade (Angus *et al.*, 2001; Arefian *et al.*, 2017). No quadro abaixo é possível observar as características dos custos hospitalares médios em dólares por estadia de pacientes com sepse em diversas regiões geográficas e em diferentes grupos de pacientes.

Tabela 1 – Características do estudo sobre custos hospitalares médios por estadia em dólares.

Custos Médios Totais	
Região Geográfica de Estudo	
Estados Unidos	US\$ 32.421 (14.809 - 75.015), n=10
Europa	US\$ 37.424 (16.810 – 62.652), n=8
Ásia	US\$ 13.292, n=1
América do Sul	US\$ 24.284, n=1
Faixa Etária	
Crianças	US\$ 75.015, n=1
Adultos	US\$ 25.998 (13.291 – 58.536), n=15
Não declarado	US\$ 33.266 (24.284 – 62.652), n=4

Fonte: ADAPTADO de Arefian, Habibollah *et al.*, 2017.

Os dados epidemiológicos do Brasil ainda são escassos. De acordo com o ILAS, cerca de 600.000 pessoas são diagnosticadas com sepse por ano, sendo essa a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva (UTIs), possuindo uma das maiores taxas de letalidade do mundo (ILAS, 2017, pp. 20). Dados da literatura demonstram que o número total de hospitalizações e internações em UTIs ocasionadas pelo quadro séptico, tem aumentado gradativamente ao longo dos anos no Brasil (Lobo *et al.*, 2019). No Brasil, a predominância de casos está no sexo masculino (55,7%) e a maioria dos pacientes está inserida na faixa etária dos idosos, possuindo uma idade média de 61 anos (Sales Júnior *et al.*, 2006).

O ILAS também destaca que a mortalidade ocasionada pela sepse é mais alta nos hospitais públicos vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS), tendo uma taxa de 58,5%, se diferenciando da taxa de letalidade das instituições privadas, que gira em torno de 34%. As potenciais razões que explicam esse cenário incluem o despreparo de profissionais da saúde, gerando um reconhecimento tardio da doença, agravando o quadro clínico dos pacientes, além das dificuldades na aplicação do tratamento adequado para cada indivíduo. A falta de infraestrutura e a quantidade reduzida de equipe médica nos hospitais públicos do país, também estão incluídos nos fatores que dificultam o diagnóstico e tratamento rápido e preciso (Silva *et al.*, 2004; Oliveira, 2017). Esses pontos dificilmente são encontrados nas instituições privadas, que possuem uma gestão de qualidade, infraestrutura adequada e muitos profissionais disponíveis para o atendimento dos pacientes (ILAS, 2017, pp. 21).

No 11º Congresso Brasileiro de Medicina Interna, realizado em Curitiba em 2014, foi feito um estudo de prospecção de casos futuros de sepse no país, e o resultado sugeriu um aumento de 140% dos casos de sepse nos 10 anos seguintes (Araújo, 2014; Oliveira, 2017). Conforme alguns pesquisadores apontam, os motivos que explicam essa análise são diversos e compreendem o envelhecimento da população, tornando-a mais susceptível a doença, além do aumento da utilização de medicamentos com altos efeitos colaterais em pacientes graves, o crescimento nos índices de processos invasivos de alto risco, em todos os grupos populacionais, como intervenções cirúrgicas, e a identificação de microrganismos com maior virulência, resistentes as terapias já existentes, dificultando ainda mais o tratamento eficaz para a doença (Cohen *et al.*, 2015).

Devido a diversidade de microrganismos que podem iniciar o quadro séptico, a alta frequência mundial da doença, a associação com elevadas taxas de mortalidade, o alto custo hospitalar, além do aumento gradativo das hospitalizações e da prospecção de um crescimento de mais de 100% dos casos de sepse no Brasil, o país enfrenta um cenário muito problemático quando relacionado a sepse, gerando transtornos econômicos e principalmente uma grande perda de vidas (Lobo *et al.*, 2019).

1.1.3 Sintomatologia e Tratamento

Os sinais e sintomas presentes na sepse são muito variáveis e inespecíficos, além de serem influenciados por diversos fatores, como a virulência do agente patológico, carga microbiana, porta de entrada no organismo (Tabela 2) e susceptibilidade do hospedeiro, de acordo com variações genéticas, estado nutricional, idade, entre outros (Lever e Mackenzie, 2007; Cho e Choi, 2014). As manifestações clínicas geradas podem ser confundidas com outras patologias, inclusive processos não infecciosos, ou muitas vezes podem ocorrer sem que o profissional de saúde perceba. Por esses motivos, muitas vezes o diagnóstico correto é tardio, o que aumenta as estatísticas de mortalidade da doença (Araújo, 2014; Oliveira, 2017).

Tabela 2 – Exemplos de fatores que afetam os sinais e sintomas da sepse.

Fator e organismo	Local	Efeito
Virulência de patógeno		
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Pele	Celulite, febre, dor localizada e vermelhidão
<i>Streptococcus pyogenes</i> + SPE-C*	Pele	Choque tóxico, com hipotensão, oligúria, estado mental alterado e coagulopatia
Carga microbiana		
<i>Salmonella typhimurium</i> , 10 ³ unidades formadoras de colônias	Intestino	“Estômago roncando” e diarreia
<i>Salmonella typhimurium</i> , 10 ⁵ unidades formadoras de colônias	Intestino	Colite hemorrágica com febre, desconforto abdominal
Porta de entrada		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Trato renal	Pielonefrite com febre, taquicardia, hipotensão, dor lombar
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Trato respiratório	Pneumonia com febre alta, rigidez, mialgia, tosse produtiva, taquipneia, taquicardia e hipotensão
Suscetibilidade do hospedeiro		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Trato respiratório, adulto	Pneumonia, com febre, calafrios, dispneia e dor no peito
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Trato respiratório, idoso	Declínio do estado mental, confusão, perda de consciência
Evolução temporal		
<i>Neisseria meningitidis</i>	Sangue, diagnóstico rápido	Febre, mal-estar, mialgia, artralgia, dor de cabeça, mas sem sinais localizados
<i>Neisseria meningitidis</i>	Sangue, diagnóstico tardio	Choque séptico, com hipotensão, oligúria, estado mental alterado e erupção cutânea generalizada
*SPE-C: Exotoxina pirogênica estreptocócica C.		

Fonte: ADAPTADO de Lever e Mackenzie, 2007.

Os principais sinais e sintomas que surgem durante o desenvolvimento da sepse incluem febre ou hipotermia, taquicardia, tosse, dispneia, taquipneia, cefaleia, retenção de líquidos, diminuição da pressão arterial, manchas pelo corpo, níveis elevados de glicose na corrente sanguínea, perda de aproximadamente 10% do peso corporal em poucas semanas, além da disfunção orgânica, como é o caso da disfunção neurológica, sendo observada por meio da alteração do estado mental do paciente (Figura 2) (Lever e Mackenzie, 2007; ILAS, 2017, pp. 25).

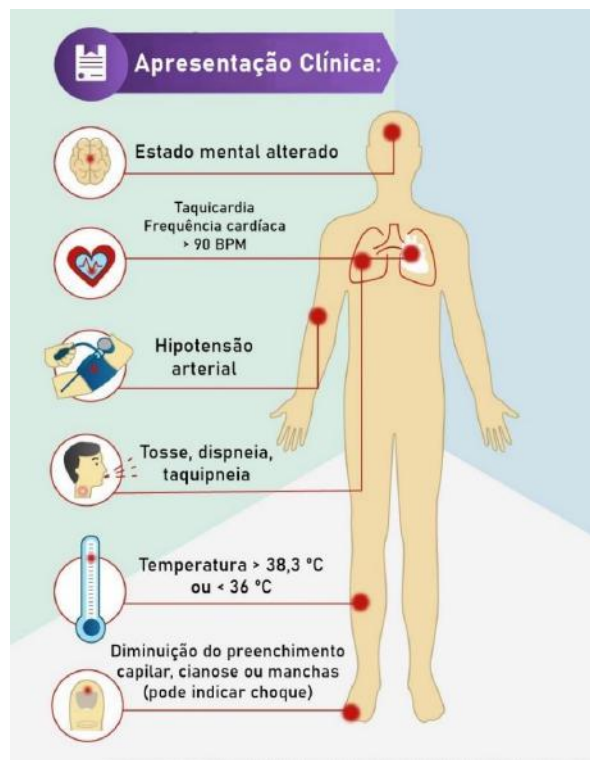


Figura 2. Representação clínica dos principais sinais e sintomas presentes no desenvolvimento da sepse. Os principais sinais e sintomas da sepse incluem estado mental alterado, indicativo de disfunção neurológica, a taquicardia, hipotensão arterial, tosse, dispneia, taquipneia, febre ou hipotermia, diminuição do preenchimento capilar, cianose ou manchas, esses últimos podendo indicar um quadro mais grave, o choque séptico. (Fonte: ADAPTADO de www.nursingcenter.com).

A disfunção de órgãos ocorre porque um dos aspectos mais importantes da sepse é a alteração hemodinâmica, que nessa doença é caracterizada pela redução da pressão arterial, causando hipotensão. A hipotensão pode ser causada por diversos fatores, entre eles estão a vasodilatação e o aumento da permeabilidade capilar, fenômenos encontrados na fisiopatologia da sepse (Cohen, 2002). A baixa pressão arterial, e outros processos simultâneos que estão presentes no quadro clínico, contribuem para a redução da oferta tecidual de oxigênio, causando um desequilíbrio entre a sua disponibilidade e o consumo, culminando no metabolismo anaeróbico com alta produção de lactato e morte celular, uma vez que as mitocôndrias possuem dificuldades na utilização do oxigênio (Uhle *et al.*, 2015). A condição de anaerobiose e a morte

celular nos tecidos resultam nas disfunções orgânicas, assim, se torna possível observar o aparecimento de sinais de hipoperfusão dos órgãos, como alteração da função cerebral sendo notada através do comportamento modificado e confusão do paciente, oligúria, acidose láctica, entre outros (Cohen, 2002; Lever e Mackenzie, 2007; Uhle *et al.*, 2015). As principais disfunções encontradas na sepse são a cardiovascular, respiratória, neurológica, renal, hematológica, gastrointestinal, hepáticas e endocrinológicas (ILAS, 2017, pp. 25-30).

Além disso, os sinais de resposta inflamatória também são relevantes marcadores para o diagnóstico da infecção, ainda que inespecíficos. Esses marcadores são constantemente encontrados durante a sepse, e incluem a leucocitose ou leucopenia, aumento da quantidade de citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea devido a ativação de células do sistema imune, como a Interleucina 6 (IL-6) e a diminuição de moléculas anticoagulantes, como a proteína C, que são consumidas pela resposta inflamatória e tem seus efeitos inibidos pela intensa atividade pró-coagulante que é desencadeada no início da instalação do quadro clínico (Cohen, 2002; Naschitz e Paz, 2009).

A terapia antimicrobiana é a principal alternativa de tratamento para a sepse e deve ser iniciada assim que os primeiros sinais e sintomas forem verificados, isso porque a redução da carga bacteriana ou fúngica é crucial para controlar a resposta imunológica, essa que é responsável por grande parte dos danos produzidos no organismo durante a sepse (Rhodes *et al.*, 2017; Levy *et al.*, 2018). Na primeira hora após o reconhecimento da sepse, são administrados antibióticos de amplo espectro, como o fármaco Meropenem (Brunkhorst *et al.*, 2012), pois a demora na obtenção de resultados dos testes de cultura para identificação do agente causador, atrasam a implementação da terapia, um fator que está fortemente ligado a altas taxas de mortalidade. Além disso, estudos demonstram que em 20% dos pacientes com sepse, não é possível detectar o agente causador, assim, a antibioticoterapia de largo espectro deve ser utilizada (Salomão *et al.*, 2011; Trindade *et al.*, 2014).

Estão incluídos nos sinais claros do quadro clínico a alteração hemodinâmica, e por isso, a administração de fluidos intravenosos também é uma das primeiras abordagens recomendadas quando há reconhecimento da sepse (Gush *et al.*, 1990; Rhodes *et al.*, 2017; Levy *et al.*, 2018). Os fluidos mais utilizados são as soluções cristaloides, mas dados da literatura apontam que, a reposição volêmica em pacientes com sepse pode ser feita através de transfusões sanguíneas, uma alternativa benéfica, já que além de recuperar o volume de sangue perdido, pode aumentar a quantidade de eritrócitos disponíveis, resultando na melhoria do transporte de oxigênio e fornecimento do mesmo aos diversos tecidos do organismo (ILAS, 2017, pp.37-38).

Nos casos em que os pacientes permanecem hipotensos mesmo após a ressuscitação de líquidos inicial, o uso de vasopressores se torna necessário (Peninck e Machado, 2012). Segundo recomendações internacionais de organizações de saúde, a droga de primeira escolha é a noradrenalina, podendo ser substituída pela adrenalina (Rhodes *et al.*, 2017; Levy *et al.*, 2018). Existem ainda os pacientes que não respondem à reposição volêmica, nem ao uso de vasopressores, se mantendo hipotensos apesar dos esforços iniciais, principalmente aqueles que já estão na fase de choque séptico. Para esses indivíduos, é recomendado o uso de corticoides, sendo a hidrocortisona a droga recomendada, em doses preferencialmente baixas (Nguyen *et al.*, 2006; Grelon *et al.*, 2014; Levy *et al.*, 2018).

As disfunções endocrinológicas também são muito frequentes em pacientes com sepse, sendo a hiperglicemia e a resistência à insulina um dos principais indicativos de alterações no metabolismo endócrino (ILAS, 2015, pp. 30). A hiperglicemia é um aspecto preocupante pois pode agir como um fator pró-coagulante, aumentando os efeitos maléficos da coagulação exacerbada, com formação de trombos e consumo de moléculas anticoagulantes importantes. Além disso, o excesso de glicose no sangue pode induzir, mesmo que indiretamente, a apoptose de células, perda da função de neutrófilos, dificuldades no processo de cicatrização de feridas e está fortemente relacionada a altos índices de morte (Andersen *et al.*, 2004; Marik e Raghavan, 2004). Devido à resistência à insulina, característica presente na maioria dos pacientes sépticos, se torna necessário a terapia por meio da infusão de insulina, com a finalidade de manter estável a concentração glicêmica na corrente sanguínea. É recomendado que o tratamento com insulina se mantenha até que os níveis de glicose fiquem entre 150 e 180 mg/dL, valores considerados hiperglicêmicos em condições normais, mas que são aceitáveis para pacientes em terapia intensiva, evitando variações abruptas de glicose (Levy *et al.*, 2018).

Em resumo, as terapias disponíveis atualmente para o tratamento da sepse são limitadas ao controle da infecção com antibióticos e medidas de suporte de vida, como o uso de agentes vasopressores para a manutenção da pressão arterial e controle glicêmico, tratamentos que não são suficientes para controlar a resposta inflamatória sistêmica e para prevenir ou reverter a falência múltipla de órgãos.

1.2 Fisiopatologia

A sepse consiste em uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta inadequada do hospedeiro à uma infecção. O quadro séptico progride quando o

hospedeiro não consegue estabelecer uma resposta imune eficaz, não sendo capaz de conter a infecção primária, e isso pode ser um resultado proveniente de aspectos do próprio microrganismo, como alta carga microbiana, fatores de virulência, resistência a opsonização e a antibióticos (Bone *et al.*, 1992; Singer *et al.*, 2016). Porém, o desenvolvimento da sepse após uma infecção não é determinado apenas pelo microrganismo causador, já que as características intrínsecas do hospedeiro, como o perfil genético, podem estar relacionadas com a instalação do quadro. O somatório desses fatores provoca uma cadeia de eventos compostos de respostas imunes inatas e adaptativas, incluindo a ativação de cascatas de coagulação, sistema endotelial vascular, alterações metabólicas e hemodinâmicas (Cho e Choi, 2014).

Cada microrganismo possui particularidades referentes ao seu padrão molecular, como o polissacarídeo quitina presente na parede celular de fungos, ou o lipopolissacarídeo na membrana das bactérias gram-negativas. Esses elementos únicos de cada microrganismo são denominados de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). Devido a uma simples quebra de barreiras anatômicas ou a redução da capacidade imunológica de um indivíduo, um microrganismo consegue invadir e se multiplicar em um tecido específico. Através dos PAMPs, células do sistema imune inato são capazes de reconhecer, identificar e promover uma resposta para eliminar os microrganismos invasores (Gazzinelli *et al.*, 2014; Poll *et al.*, 2017).

As células do sistema imune inato possuem mecanismos específicos para reconhecer os PAMPs, compreendendo estruturas altamente especializadas, aptas para responder imediatamente um insulto, denominados como receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), como por exemplo, os receptores do tipo Toll ou receptores toll-like (TLRs). Esses receptores estão presentes em células como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, e vão interagir com as moléculas conservadas dos microrganismos. Existem muitos RRP e cada um deles identifica um padrão molecular específico, por exemplo, o TLR-4 é responsável por reconhecer um lipopolissacarídeo presente em bactérias gram-negativas, enquanto que o TLR-2 reconhece um peptidoglicano de bactérias gram-positivas (Bianchi, 2007).

Quando um PAMP se liga a um RRP, uma sinalização intracelular é desencadeada, com a finalidade de aumentar a produção de moléculas pró-inflamatórias, como a interleucina- 1β e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), que são capazes de gerar uma resposta imune adequada contra o microrganismo em questão. Esses mediadores inflamatórios estimulam a ativação de outras células do sistema imune, que por sua vez vão produzir ainda mais componentes pró-inflamatórios, providenciando uma resposta rápida ao invasor. Além disso, macrófagos e neutrófilos ativados são responsáveis pela liberação de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), na tentativa de eliminar o

microrganismo causador da infecção, e essas moléculas favorecem a instalação de um quadro de estresse oxidativo, representando um fator importante na patogênese da sepse (Bianchi, 2007; Hansen, 2012; Hunt *et al.*, 2014; Souza, Padua e Henriques, 2015).

O aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, ROS e RNS promovem a inflamação tecidual e lesão celular, causando a liberação de Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs), componentes endógenos provenientes de células que passaram por situações de estresse ou foram danificadas de alguma forma. Os DAMPs são capazes de ativar a resposta imune de maneira independente dos patógenos que causaram a infecção. Assim, os PAMPs e os DAMPs, em conjunto, estimulam a instalação de uma resposta imunológica exacerbada. Entre os DAMPs liberados durante a sepse, se destacam o heparan-sulfato, um polissacarídeo encontrado nas células de vasos sanguíneos, e o fibrinogênio, uma glicoproteína relacionada ao processo de coagulação (Cohen, 2002; Bianchi, 2007; Poll *et al.*, 2017). Além disso, lipídeos peroxidados, proteínas de choque térmico e a proteína de grupo 1 de alta mobilidade (HMGB-1) também são considerados DAMPs e estudos mostram que suas expressões estão significativamente aumentadas durante quadros inflamatórios, como o que acontece na sepse (Uchida, 2013; Roh e Sohn, 2018).

Em situações de homeostase, neutrófilos circulam normalmente na microvasculatura do organismo, sem interagir com as células endoteliais. A partir do processo infeccioso, os neutrófilos são direcionados para o sítio local da infecção e as citocinas inflamatórias produzidas regulam positivamente a adesão de neutrófilos em células endoteliais vasculares. Essa adesão ocorre através da interação entre as proteínas integrinas, que estão presentes na superfície de todos os leucócitos, e uma glicoproteína existente na superfície celular de células endoteliais, como a ICAM-1. A expressão dessas glicoproteínas superficiais é aumentada devido ao estímulo produzido pelas citocinas pró-inflamatórias, e por isso, a adesão entre neutrófilos e células da microvasculatura acontece com grande frequência. As selectinas presentes na superfície dos neutrófilos também participam desse evento, uma vez que são responsáveis pela adesão de leucócitos às células endoteliais durante o processo inflamatório (Craig *et al.*, 2012; Souza, Padua e Henriques, 2015; Uhle *et al.*, 2015).

A adesão de neutrófilos na microvasculatura é uma resposta previsível criada pelo organismo, pois quando ativadas, essas células desempenham um papel fundamental na contenção da infecção, eliminando os microrganismos causadores. Entretanto, quando ocorre a instalação de uma resposta imunológica exacerbada, com elevação anormal nos níveis de citocinas inflamatórias, como acontece na fase aguda da sepse, a grande quantidade de neutrófilos ativados aderidos ao endotélio, resulta na liberação de substâncias danosas ao vaso

endotelial, como oxidantes, fosfolipases e proteases, que por sua vez são prejudiciais a integridade do endotélio, aumentando assim a permeabilidade vascular (Cohen, 2002; Poll *et al.*, 2017; Jundi *et al.*, 2019). Além disso, as células endoteliais ativadas secretam um componente com alta capacidade vasodilatadora, o óxido nítrico (NO). Esse efeito vasodilatador gerado pela produção de NO não é notado imediatamente, porque a frequência cardíaca e o débito cardíaco são aumentados na tentativa de corrigir as alterações hemodinâmicas causadas pela liberação de NO, porém, como a resposta imune é mantida e as células ativadas continuam liberando essa substância vasodilatadora, a capacidade de compensar deixa de ser suficiente e a hipotensão se torna um sinal clínico aparente. O aumento da permeabilidade vascular e o estímulo vasodilatador que resulta na hipotensão, promovem a formação de edema e a redução acentuada da oferta tecidual de oxigênio, respectivamente (Clark *et al.*, 2006; Sahu *et al.*, 2013; Jundi *et al.*, 2019).

A lesão endotelial pode ainda influenciar na regulação do equilíbrio entre a coagulação e a anti-coagulação. As lesões da microvasculatura provenientes da resposta inflamatória permitem a passagem de uma molécula pró-coagulante produzida regularmente pelas células que revestem o endotélio dos vasos sanguíneos, denominada de fator tecidual (FT), para o lúmen dos vasos sanguíneos, iniciando um processo de coagulação sanguínea. As citocinas inflamatórias envolvidas, como IL-6 e IL-1 β , também estimulam a liberação de FT pelas células do sistema imune, amplificando o estímulo pró-coagulante. Normalmente existe um equilíbrio entre a resposta pró-coagulante e anticoagulante, dessa forma, quando há o início da coagulação, o organismo produz moléculas capazes de balancear esse processo, como por exemplo a proteína C ativada, um importante inibidor da via que produz o FT. No entanto, a intensa resposta inflamatória do quadro séptico consome os anticoagulantes naturais e ocorre uma perturbação do equilíbrio pró-coagulante e anticoagulante. Assim, o processo de coagulação se mantém, gerando a formação de trombina e consequente obstrução dos vasos sanguíneos, resultando no desenvolvimento da isquemia (Amaral *et al.*, 2004; Zeerleder e Hack, 2005; Schouten *et al.*, 2008; Levi e Poll, 2017).

Paralelamente a esse processo, um fenômeno denominado de hipóxia citopática pode ocorrer. Esse evento acontece quando a mitocôndria, organela essencial para o metabolismo celular, tem sua atividade reduzida e seu funcionamento prejudicado. Essa inibição da atividade mitocondrial gera danos na membrana da organela, favorecendo ainda mais a perda de função da mitocôndria. Sendo assim, a hipóxia citopática é caracterizada pelos danos gerados na membrana mitocondrial, que resultam no comprometimento do metabolismo aeróbico, mesmo quando a disponibilidade de oxigênio é adequada (Fink, 2000; Fink, 2002).

Além disso, a hipotensão e hipoperfusão dos tecidos, resulta no comprometimento do processo aeróbico que é dependente de oxigênio. Por esses motivos, as células optam pelo metabolismo anaeróbico, e através desse processo muitas moléculas de lactato são geradas, evidenciando a hiperlactatemia, sinal clínico frequentemente observado em pacientes sépticos. Devido à ausência de oxigênio na cadeia respiratória, espécies reativas de oxigênio são liberadas, aumentando os danos mitocondriais e culminando na morte celular. Logo, a baixa oferta de oxigênio está diretamente ligada a lesão tecidual e consequente perda de função dos órgãos (Schwartz *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2019).

A resposta imunológica produzida pela ativação das células imunes através do reconhecimento de PAMPs e DAMPs, o aumento na produção de mediadores inflamatórios, ROS e RNS, os danos gerados na microvasculatura endotelial, a hipotensão e hipoperfusão dos tecidos, culminam no aparecimento de sinais sistêmicos, como alterações do metabolismo e modificações hemodinâmicas. Portanto, todos esses eventos contribuem para a disfunção orgânica característica do quadro séptico (Figura 3) (Cohen, 2002; Bianchi, 2007; Naschitz e Paz, 2009; Poll *et al.*, 2017; Romanova, 2019).

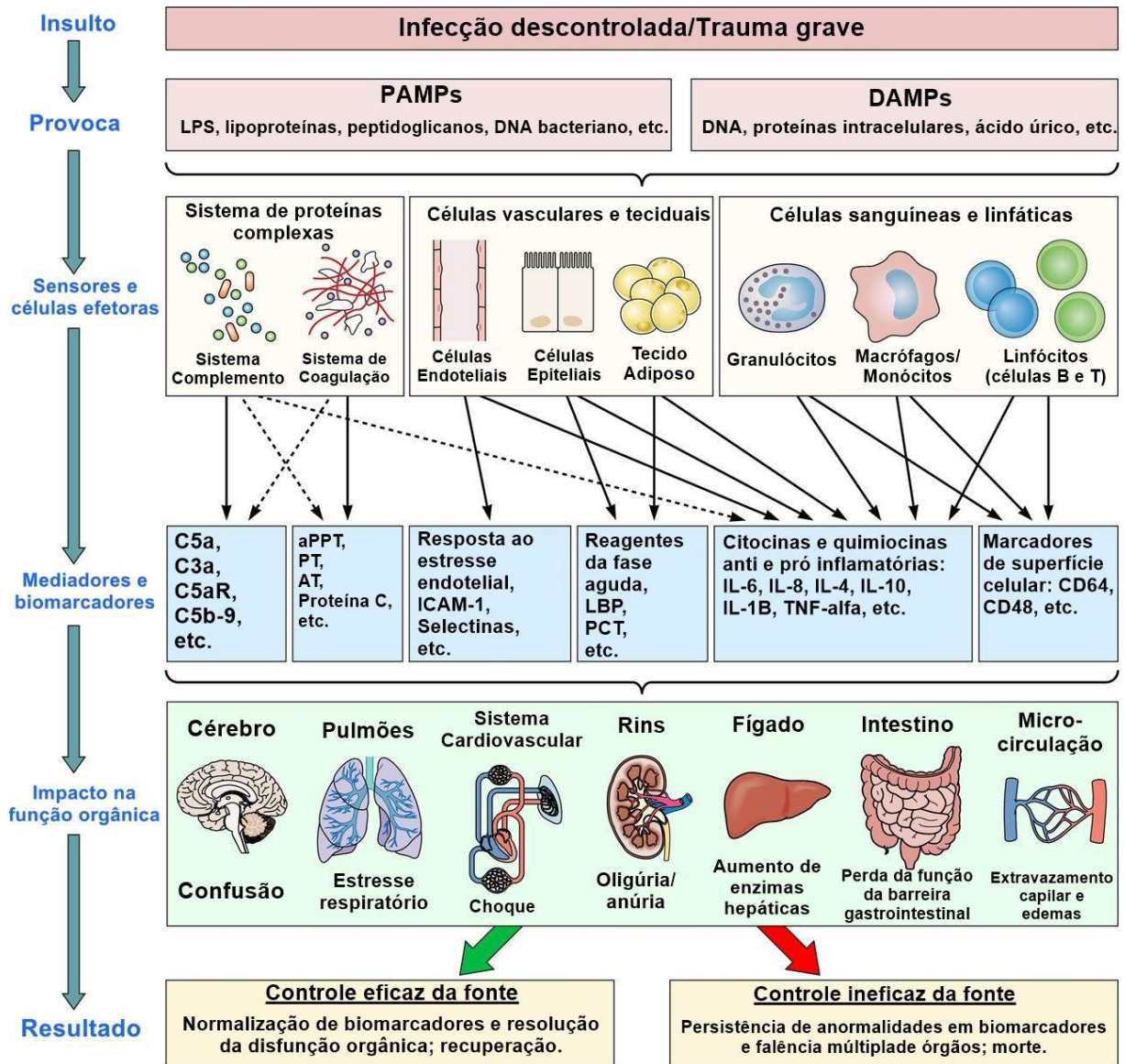


Figura 3. Esquema da fisiopatologia da sepse. Um insulto inicial ao organismo, que pode ser representado por uma infecção descontrolada ou um trauma grave, provoca a liberação de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), lipoproteínas, peptidoglicanos, DNA bacteriano, etc, e Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs), como DNA, proteínas intracelulares, ácido úrico, etc. Essas moléculas são responsáveis por ativar sensores e células efetoras, tais como o sistema de proteínas complexas que incluem o sistema complemento e o sistema de coagulação, células vasculares e teciduais como as células endoteliais, epiteliais e o tecido adiposo, além de ativar células sanguíneas e linfáticas, que englobam os granulócitos, macrófagos/monócitos e linfócitos B e T. Esses sistemas e células ativadas, por sua vez, expressam e liberam diversos mediadores e biomarcadores. No caso do sistema de proteínas complexas, haverá a produção de uma série de fragmentos proteicos (C5a, C3a, C5aR, C5b-9, aPPT, PT, AT, Proteína C) com diferentes características e com função de auxiliar a resposta imunológica, seja através da opsonização ou de cascatas coagulantes. Quando ativadas, as células endoteliais aumentam sua resposta ao estresse causado ao endotélio vascular, através da elevação na expressão de glicoproteínas superficiais (ICAM-1) e selectinas, contribuindo para a resposta inflamatória e favorecendo também a produção de citocinas e quimiocinas anti e pró-inflamatórias. As células epiteliais e o tecido adiposo, ao serem ativados, liberam os reagentes da fase aguda, que representam uma classe de proteínas relacionadas com a inflamação, e que se encontram aumentadas na corrente sanguínea em resposta ao insulto inflamatório. Além disso, essas células também aumentam a expressão de proteínas de ligação a lipopolissacarídeos (LBP) e procalcitonina (PCT), e também estão associadas a produção de citocinas e quimiocinas anti e pró-inflamatórias. As células sanguíneas e linfáticas possuem um papel fundamental na fisiopatologia da sepse, uma vez que são as principais células encarregadas de produzir citocinas e quimiocinas de caráter anti e principalmente pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-4, IL-10, IL-1β e TNF-α) caracterizando o quadro

inflamatório sistêmico da sepse, e a expressão de marcadores de superfície (CD64, CD48) é aumentada para facilitar o processo de adesão e reconhecimento celular. Todos esses mediadores e biomarcadores culminam na reposta inflamatória exacerbada sistêmica, que resulta num impacto negativo das funções orgânicas do organismo, assim, todos os sistemas do corpo humano são afetados, entre eles o sistema neurológico, circulatório, renal e gastrointestinal, que exibem sinais de disfunção, como confusão, estresse respiratório, alterações na pressão arterial, oligúria/anúria, aumento na expressão de enzimas hepáticas, perda da função da barreira gastrointestinal, extravasamento capilar e edemas, sinais respectivos aos sistemas vitais prejudicados. Caso haja um controle eficaz da fonte causadora de todos esses efeitos, haverá a normalização de biomarcadores e resolução da disfunção orgânica com conseqüente recuperação do paciente, entretanto, se houver um controle ineficaz da fonte, ocorre a persistência das anormalidades em biomarcadores e falência múltipla de órgãos, resultando na morte do paciente. (Fonte: ADAPTADO de <https://rjjaramillo.wordpress.com/2012/11/09/sepsis/sepsis-pathways-e/>).

A resposta inflamatória que ocorre na fase aguda da sepse, comumente chamada de “tempestade de citocinas”, que pode ter como consequência a disfunção orgânica e o choque séptico, é seguida por uma fase hipoinflamatória, com liberação de mediadores anti-inflamatórios, que tentam equilibrar o intenso estágio inicial da doença. O grau e a duração dos picos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios variam entre os pacientes de acordo com a faixa etária, estado nutricional, doenças crônicas subjacentes, carga microbiana do agente causador, virulência do patógeno e fatores genéticos. A fase hipoinflamatória tem sido relacionada a maiores índices de mortalidade, pois a imunossupressão inadequada favorece o desenvolvimento de infecções secundárias, principalmente em idosos, agravando o quadro clínico dos pacientes (Hotchkiss *et al.*, 2013; Venet e Monneret, 2017).

1.3 Estresse Oxidativo

No organismo em equilíbrio, existe a produção de antioxidantes, de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), que se mantêm estáveis e que sustentam um ambiente de homeostase. A produção de ROS e RNS pode ocorrer a partir de fontes endógenas, onde se destacam a mitocôndria, mais especificamente a cadeia transportadora de elétrons, e ainda através da ativação do sistema imune. As fontes de produção de ERON também podem ser exógenas, como a partir da ingestão de álcool, que dentro do organismo é metabolizado em radicais livres. As ERON, independente de sua origem, seja endógena ou exógena, causam modificações oxidativas em moléculas celulares importantes, como lipídeos, proteínas e DNA (Hanafy *et al.*, 2001; Liguori *et al.*, 2018). Para neutralizar essa atividade tóxica, o organismo possui mecanismos de defesa antioxidantes, que protegem os tecidos da toxicidade dos radicais livres. Essa defesa antioxidante pode ter origem endógena, por meio de enzimas, como a catalase e glutathiona peroxidase, ou exógena, que incluem o ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E). O estresse oxidativo é caracterizado pelo

desequilíbrio entre a produção de ERON e a defesa antioxidante do organismo (Birben *et al.*, 2012; Kodentsova *et al.*, 2013).

O processo de estresse oxidativo pode ser resultado das respostas inflamatórias e esses dois eventos acontecem de forma simultânea durante a sepse. Macrófagos e neutrófilos ativados por mediadores inflamatórios, produzem ainda mais moléculas pró-inflamatórias e ERON, e por causa da intensa resposta inflamatória, essas moléculas são produzidas continuamente, e as defesas antioxidantes disponíveis se tornam insuficientes para controlar os níveis de ERON (Pizzino *et al.*, 2017). Estudos descrevem o estresse oxidativo em pacientes sépticos, por meio de dados que mostram uma elevação na quantidade de ERON e na depleção de antioxidantes no organismo desses indivíduos (Brealey *et al.*, 2004).

A disfunção mitocondrial ocorre de forma frequente durante o quadro de estresse oxidativo, uma vez que a grande quantidade de ERON e mediadores pró-inflamatórios que são produzidos durante a fisiopatologia de diversas doenças, incluindo a sepse, resultam na perda de função mitocondrial e consequente falha na produção de energia. Diversas moléculas presentes na estrutura da mitocôndria são afetadas durante o estresse oxidativo, como os lipídeos membranares e o próprio DNA mitocondrial. O dano oxidativo gerado nessas moléculas pode culminar na modificação estrutural da organela, diminuição da produção de ATP, dissociação do citocromo C, formação de proteínas defeituosas, inibição da atividade de enzimas envolvidas no transporte de elétrons e liberação de mais ERON. Pesquisas indicam que todos esses eventos, em especial o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial, estão fortemente associados a disfunção orgânica e a uma maior taxa de mortalidade. (Brealey *et al.*, 2004; Crouser, 2004; Galley, 2011).

A partir da oxidação de biomoléculas pelas ERON liberadas, ocorre a produção de metabólitos específicos, chamados de marcadores do estresse oxidativo, entre os quais podemos destacar a 3-Nitrotirosina (3-Nitro) e a 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), subprodutos da nitrosilação de proteínas e da peroxidação lipídica, respectivamente. Logo, a presença de tais marcadores, evidenciam a ocorrência do estresse oxidativo, um evento que está presente no processo fisiopatológico de diversas doenças, incluindo a sepse, a aterosclerose, Alzheimer, Parkinson, dentre outras (Blesa *et al.*, 2015; Tönnies e Trushina, 2017; Salim, 2020).

Dados da literatura revelam que o estresse oxidativo pode ainda induzir a senescência celular, um mecanismo que dificulta a proliferação das células, em resposta a danos que ocorrem durante a replicação. O estresse oxidativo, associado a senescência celular, são processos descritos em doenças neurodegenerativas, uma vez que os níveis de marcadores de estresse oxidativo estão elevados nessas patologias (Salim, 2017; Liguori *et al.*, 2018).

Em situações que o estresse oxidativo se torna um evento crônico, o organismo sai da condição de homeostase, e isso gera consequências negativas nos sistemas endócrinos e imunológicos. Conseqüentemente, haverá uma indução de resposta imune e liberação de moléculas pró-inflamatórias, que vão favorecer a perpetuação do estresse oxidativo, e esse ciclo se mantém sem interrupção, aumentando as chances do desenvolvimento de danos cognitivos (De la Fuente e Miquel, 2009). Baierle e colaboradores demonstraram que o aumento de marcadores de estresse oxidativo no soro de idosos, está relacionado com alta concentração de citocinas pró-inflamatórias, e ambos contribuem para a disfunção cognitiva nesses indivíduos (Baierle *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo, associado a inflamação e senescência celular, desempenham um papel importante na fisiopatologia de inúmeras doenças, sendo assim, o potencial de novos tratamentos antioxidantes deve ser avaliado. Um tipo de terapia antioxidante que vem sendo estudada, é o tratamento à base de vitaminas, sendo as principais as vitaminas A, C, D e E. Os efeitos dessas substâncias antioxidantes ainda não foram totalmente elucidados, porém estudos apontam para uma atividade promissora na prevenção dos problemas causados no organismo pelo estresse oxidativo (Kodentsova *et al.*, 2013; Wenclewska *et al.*, 2019; Zanza *et al.*, 2019).

1.4 Encefalopatia associada a sepse e neuroinflamação

Mais de 50% dos pacientes sépticos desenvolvem algum grau de encefalopatia durante o tratamento na UTI, assim a encefalopatia associada a sepse (EAS) é uma das primeiras manifestações clínicas da sepse, além disso, o impacto da sepse no tecido cerebral ocorre tão frequentemente quanto os danos em outros sistemas do organismo e está associada a uma maior mortalidade. A EAS é desencadeada devido a ação de mediadores inflamatórios e a morte de células cerebrais, caracterizando o processo de neuroinflamação (Perry *et al.*, 2007; Miller e Sadeh, 2014). As consequências clínicas da EAS incluem alterações na consciência, gerando um quadro confusional agudo (delirium) observado frequentemente em indivíduos idosos, e podem evoluir para quadros mais graves, como perda progressiva da consciência, atenção e memória, coma e morte. Essa condição também está relacionada com um aumento no comprometimento cognitivo que é detectado posteriormente, podendo se comparar com a intensidade do dano cognitivo em pacientes acometidos com a Doença de Alzheimer (DA). Atualmente o tratamento indicado para EAS e ao comprometimento cognitivo se limita ao tratamento para a sepse (Papadopoulos *et al.*, 2000; Hopkins e Jackson, 2006; Glass *et al.*, 2010; Sharshar *et al.*, 2014).

O sistema nervoso central (SNC) possui uma barreira permeável altamente seletiva, denominada de barreira hematoencefálica (BHE), que permite a proteção desse sistema, dessa forma, o SNC é considerado um ambiente imunologicamente privilegiado, quando comparado a outros locais do organismo, pois, em situações de homeostase, o SNC possui uma alta proteção e as células imunes circulantes não conseguem transpor essa barreira (Banjara e Ghosh, 2017).

Alguns estímulos de inflamação causados por uma lesão ou infecção, em níveis basais, são benéficos para o organismo, uma vez que esses estímulos induzem efeitos como a fagocitose de restos celulares e moléculas não utilizadas, além do processo inflamatório ter ligação com reparos teciduais. No SNC, a inflamação e as citocinas e quimiocinas liberadas possuem os mesmos efeitos benéficos, sendo um mecanismo importante para o desenvolvimento da aprendizagem, memória, formação de sinapses e reparação do tecido cerebral. Assim, a produção basal de mediadores inflamatórios pode ser considerada como um processo essencial para o perfeito funcionamento das células cerebrais (Heneka, Kummer e Latz, 2014; Ransohoff, 2016).

Apesar dos benéficos citados, quando o estímulo inflamatório é persistente e duradouro, havendo a liberação exacerbada de citocinas e mediadores inflamatórios, esse processo deixa de ser importante para a homeostase do SNC e passa a contribuir para a formação de um cenário de neuroinflamação aguda, devido a produção de substâncias neurotóxicas, e consequente neurodegeneração, que culminam em distúrbios do SNC e amplificam os estados de uma doença já instalada (Lee, Nagai e Kim, 2002; Kim *et al.*, 2016).

No contexto de uma inflamação sistêmica, os mediadores inflamatórios possuem a capacidade de atravessar a BHE e induzir diversos efeitos no tecido cerebral. Isso acontece porque existe uma comunicação entre a inflamação periférica e o SNC, que se baseia, por exemplo, através da disseminação de mediadores inflamatórios na corrente sanguínea (Papadopoulos *et al.*, 2000).

Estudos demonstram que citocinas inflamatórias, em especial IL-1 β e TNF- α , em conjunto com a redução da oferta do fluxo sanguíneo no tecido cerebral, geram uma disfunção da BHE. Isso acontece, pois, essas citocinas causam danos em proteínas integrais de junção estreita nas células que compõem a BHE, como as ocludinas, e a hipoperfusão leva a morte celular devido a disfunção mitocondrial. Portanto, a integridade e permeabilidade da BHE são prejudicadas quando ocorre um grande e constante estímulo inflamatório. Essa disfunção da BHE gera ativação de células gliais, como astrócitos e microglias, que contribuem ainda mais para a manutenção da neuroinflamação (Perry *et al.*, 2007; Sharshar *et al.*, 2014).

Em condições normais, as células gliais são encontradas exercendo papéis fisiológicos de manutenção homeostática, onde ocorre a produção de moléculas anti-inflamatórias, como a citocina IL-10, e fatores neurotróficos que favorecem o funcionamento e a manutenção das demais células do SNC, como a proteína S100 β . No estado de ativação, essas células produzem mediadores pró-inflamatórios em resposta a uma lesão ou infecção, tendo como objetivo potencializar a resposta imunológica e combater o agente infeccioso. Normalmente essa resposta é limitada e se encerra quando a infecção é resolvida e o reparo tecidual é concluído (Glass *et al.*, 2010; Miller e Sadeh, 2014; Banjara e Gosh, 2017).

Entretanto, em alguns casos, quando o estímulo inflamatório não é interrompido, a disfunção da BHE ocasiona a intensa ativação de células gliais, desregulando a resposta desses tipos celulares, aumentando a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, que podem atuar diretamente no funcionamento de neurônios, comprometendo o metabolismo e função dos mesmos, induzindo a apoptose, prejudicando o estabelecimento de sinapses e perturbando o processo de neuroplasticidade, gerando sequelas neurodegenerativas a curto ou longo prazo, favorecendo então o processo de neuroinflamação (Figura 4). Isso acontece, por exemplo, durante a inflamação sistêmica que ocorre durante a sepse (Papadopoulos *et al.*, 2000; Hopkins e Jackson, 2006; Glass *et al.*, 2010; Miller e Sadeh, 2014).

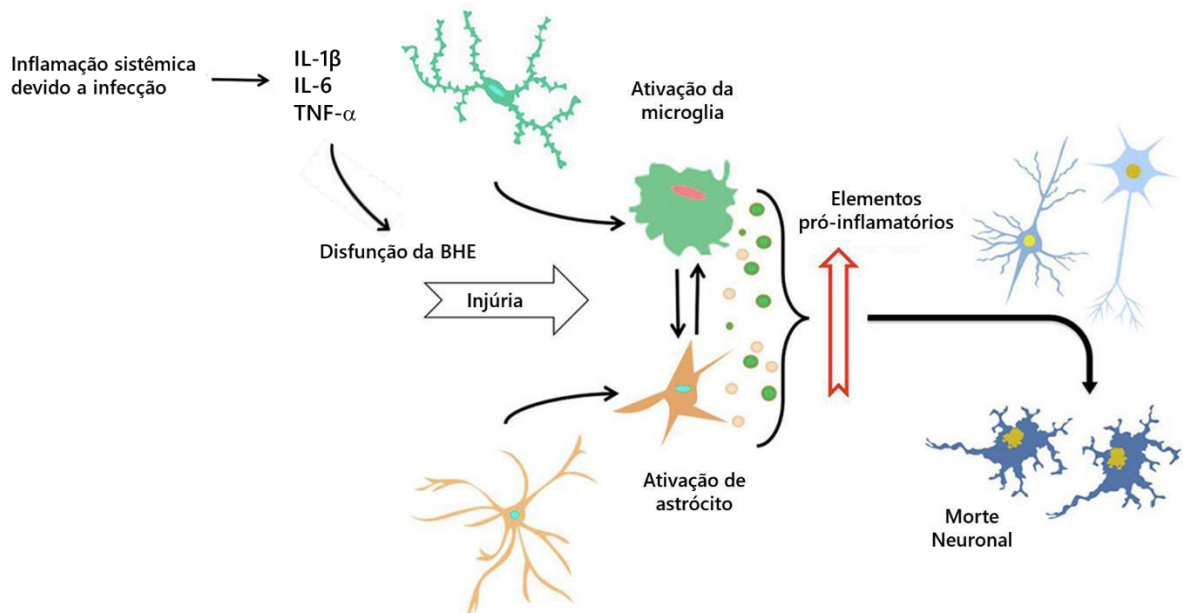


Figura 4. Esquema do processo de neuroinflamação. Durante a inflamação sistêmica causada por uma infecção, algumas citocinas pró inflamatórias são liberadas, em especial IL-1B, IL-6 e TNF- α . Essas citocinas resultam na disfunção da BHE, e tal injúria culmina na ativação de células como microglia e astrócitos, que por sua vez vão aumentar a liberação de mediadores pró inflamatórios, que por fim ocasionam a morte neuronal. (Fonte: ADAPTADO de Front. Cell. Neurosci., 2014).

Logo, a resposta inflamatória e a conseqüente neuroinflamação, representam um programa especializado contra patógenos microbianos, mas também induzem a produção de fatores que são capazes de gerar efeitos deletérios e contribuir para patologias. Existem claras evidências de que a inflamação, ativação de microglia e astrócitos e a decorrente neuroinflamação estão muito relacionadas com doenças neurodegenerativas, entre elas a Doença de Alzheimer (DA), Doença de Parkinson (DP), esclerose lateral amiotrófica (ELA) e encefalopatia associada a sepse (EAS) (Glass *et al.*, 2010).

1.5 Dano Cognitivo

Segundo dados da literatura, o comprometimento neurológico é frequente em pacientes sobreviventes após a sepse e EAS, e isso também foi documentado em pacientes sobreviventes de outras doenças inflamatórias sistêmicas que geram algum tipo de dano cerebral, como a malária cerebral (Bondi, 1992; Carter *et al.*, 2004). As sequelas neurológicas desenvolvidas nesses indivíduos podem ser revertidas ou não, isso depende de diversos fatores, como o tipo de tratamento adotado (Gool *et al.*, 2010).

Estudos indicam que as deficiências neurocognitivas persistem por meses e anos, sendo um importante parâmetro para a explicação da taxa de mortalidade em noventa dias após sepse, que gira em torno de 40%, e a mortalidade em 5 anos após a sepse, equivalente a cerca de 80% (Iwashyna *et al.*, 2010). Mesmo que os pacientes sobrevivam, eles podem ter conseqüências impactantes, que resultam na diminuição da qualidade de vida dos mesmos, reduzindo assim a chance de retornar ao trabalho, a capacidade funcional, capacidade de executar atividades diárias e perda de memória, além dos efeitos socioeconômicos no decorrer da recuperação dos sobreviventes, uma vez que a deficiência física e cognitiva impõem ainda mais gastos às famílias (Michels, Steckert, *et al.*, 2015).

Iwashyna e colaboradores (2010) demonstraram que a sepse aumenta as chances de comprometimento cognitivo e incapacidade funcional a longo prazo, através de diversas entrevistas aos sobreviventes ou seus respectivos cuidadores, avaliando a necessidade de assistência para realização de atividades diárias, como vestir-se, caminhar, comer, ir ao banheiro, preparar refeições, fazer ligações telefônicas, administrar dinheiro, entre outras. Os pacientes foram divididos em 3 grupos, de acordo com a pontuação total equivalente ao nível de assistência necessária para cumprir tais tarefas antes do quadro séptico, eles foram considerados acometidos com poucas limitações funcionais (nenhuma necessidade de assistência), limitações leves e moderadas (1 a 3 atividades diárias necessitavam de assistência)

ou limitações severas (4 ou mais atividades diárias necessitavam de assistência). Essas necessidades também foram analisadas após a sepse e foram comparadas com as necessidades antes do quadro séptico, servindo como seu próprio controle e evidenciando assim os casos de desenvolvimento ou elevação do comprometimento cognitivo em decorrência da doença.

Esse estudo documentou que a sepse e a EAS estão associadas ao desenvolvimento de novas limitações entre os pacientes que não apresentavam nenhum tipo de necessidade pré-sepse e ainda que os pacientes com limitações leves e moderadas antes da sepse tiveram um acréscimo significativo de comprometimento cognitivo, aumentando o nível de necessidade de assistência para realizar atividades diárias. Entretanto, pacientes com um funcionamento cognitivo já comprometido antes da doença, não apresentaram mudanças significativas em seu dano cerebral, esse comprometimento apenas foi mantido (Figura 5) (Iwashyna *et al.*, 2010).

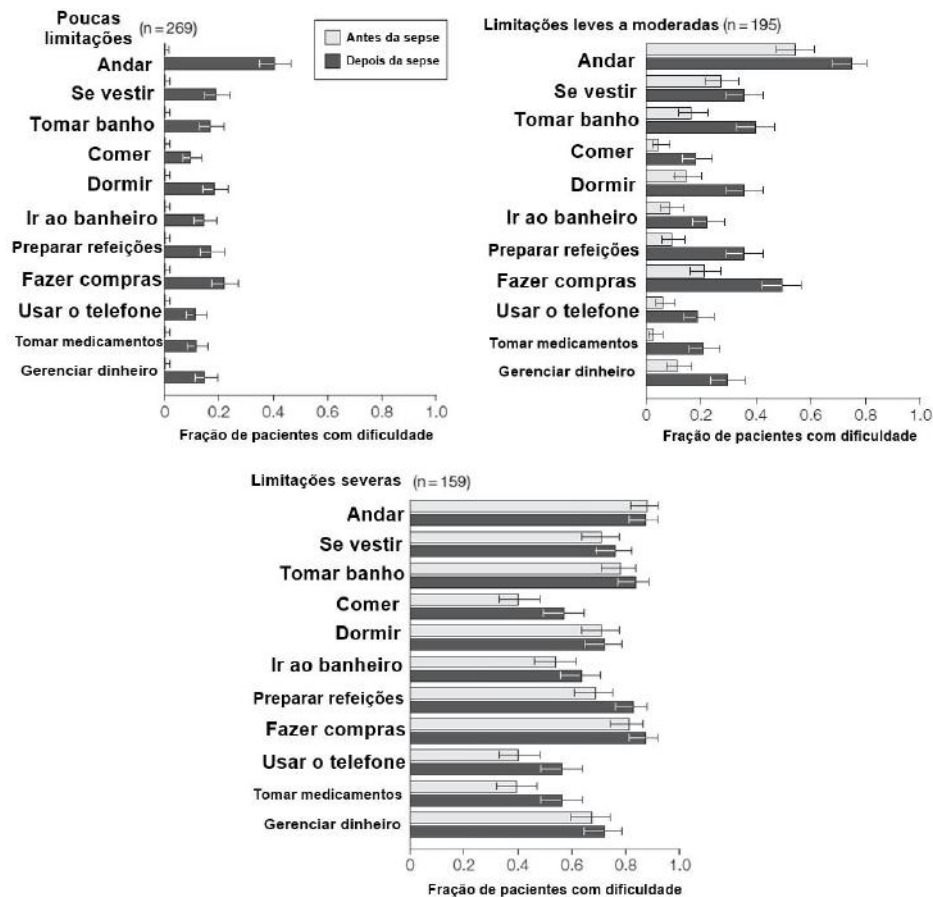


Figura 5. Mudanças na capacidade de execução de atividades diárias e instrumentais. A imagem demonstra que ocorre um comprometimento na execução de atividades diárias e instrumentais em pacientes sobreviventes da sepse e EAS. Houve uma grande variedade de novas dificuldades adquiridas pós-sepse nos grupos que possuíam poucas limitações e leves e moderadas limitações antes da sepse. O grupo com limitações severas antes da sepse não obteve uma mudança significativa de dificuldades pós-sepse, os problemas cognitivos se mantiveram. (Fonte: ADAPTADO de Iwashyna *et al.*, 2010).

Os danos cerebrais que geram tais comprometimentos cognitivos já foram documentados em regiões importantes do cérebro, como córtex e o hipocampo, estruturas cerebrais essenciais para a consolidação de memórias de curto e longo prazo. Quando essas estruturas são deterioradas, devido a uma infecção, falta de oxigênio ou outras causas, pode ocorrer um comprometimento de diversas esferas cognitivas, principalmente relacionada a memória, que pode acabar se tornando uma sequela persistente, dificultando a prática de hábitos diários, como observado no exemplo do estudo anterior (Sumadhya, Chaturaka e Senaka, 2010).

As memórias são classificadas de diferentes maneiras, uma delas é de acordo com seu conteúdo, sendo divididas em dois grupos: memórias declarativas (adquiridas por fatos ou conhecimentos) ou memórias não declarativas, de procedimentos ou hábitos (andar de bicicleta, tocar um instrumento, dentre outros). As memórias não declarativas estão relacionadas com hábitos do dia a dia, em que praticamos ações de maneira involuntária, inconsciente, como por exemplo, o ato de dirigir um carro, quando não há necessidade de evocar conscientemente alguma memória para realizar essa atividade. Por outro lado, as memórias declarativas estão associadas a capacidade de recordar lugares e pessoas específicas e lembranças afetivas, são aquelas que podem ser evocadas de forma consciente, quando há o desejo de lembrar de algo (Csábi *et al.*, 2016). As memórias declarativas também podem ser divididas através da sua temporalidade, ou seja, de curta ou longa duração. As memórias de curta duração são aquelas geradas nas primeiras horas após o aprendizado, e as memórias de longa duração demoram horas para serem formadas e são consideradas duradouras (Izquierdo *et al.*, 2008).

Diversas estruturas cerebrais participam da formação e consolidação da memória, porém o hipocampo é reconhecido por desempenhar um dos papéis mais importantes durante esse processo. O hipocampo é constituído por finas camadas de neurônios, que se dispõem uma sobreposta a outra, e suas regiões mais estudadas são as regiões CA1, CA3 e o giro denteado (Figura 6). Todos os eventos que acontecem no hipocampo são transmitidos a outras áreas cerebrais, como o córtex, por meio de cascatas de sinalização via receptores glutamatérgicos, além dos dopaminérgicos, adrenérgicos e serotoninérgicos (Izquierdo e Medina, 1997).

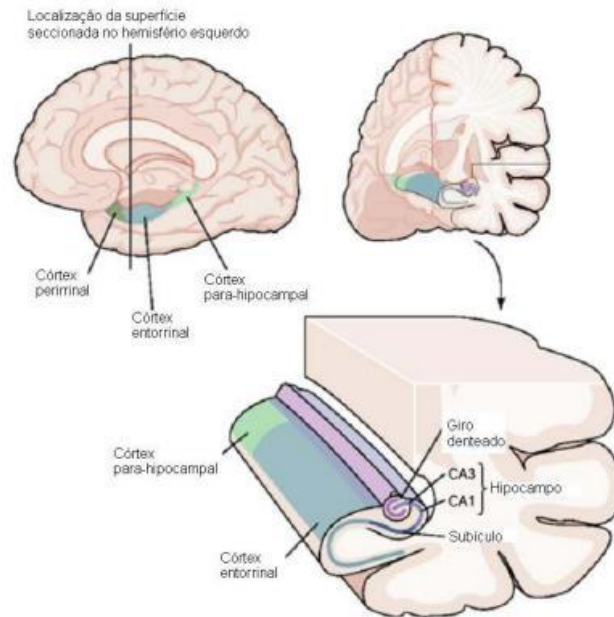


Figura 6. Organização anatômica das regiões do hipocampo. (Fonte: Kandel et al., 2000).

O processo de formação e consolidação de memória ocorre no hipocampo e depende de uma sequência de processos bioquímicos, onde se faz necessário a ativação de três tipos diferentes de receptores glutamatérgicos, o AMPA (α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico), o NMDA (N-metil-D-aspartato) e receptores metabotrópicos. Os receptores NMDA, quando ativados, são responsáveis por recrutar proteínas relacionadas com a sinalização celular, que culminam na formação de memória e aprendizagem, dessa forma, esse receptor ganha um destaque quando comparado aos demais. Quando estão inativados, esses receptores têm seu canal iônico bloqueado pelo íon Mg^{2+} , e só são ativados durante a despolarização neuronal, pois esse processo permite o deslocamento do íon Mg^{2+} e assim ocorre a liberação e abertura do canal iônico que antes se encontrava bloqueado pela ação do Mg^{2+} (Wang e Peng, 2016).

Quando ocorre a produção e liberação de glutamato pré-sináptico, o receptor NMDA pós-sináptico é ativado e acontece a retirada de íons de Mg^{2+} e simultaneamente o influxo do íon Ca^{2+} . Em seguida, ocorre a ativação de variadas cascatas bioquímicas que resultam na ativação de proteínas quinase (PKA, PKC, PKG e CAMKII) e na indução da expressão de fatores transcricionais fundamentais para a síntese de moléculas relacionadas com a plasticidade neuronal e formação e consolidação de memória (Figura 7) (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 2008).

A ativação de vias bioquímicas como MAPK e PI3K/AKT levam à produção de fatores de transcrição, como S6, que quando ativados por meio de proteínas quinase se encaminham ao

núcleo para induzir a formação de neurotrofinas, uma família de proteínas que favorece o desenvolvimento, sobrevivência e estimulam as funções neuronais. Essas neurotrofinas são responsáveis por impulsionar a síntese de proteínas que favorecem a transmissão sináptica, favorecendo o estabelecimento da potenciação de longa duração (LTP), que caracterizam uma melhora duradoura na transmissão de sinapses entre dois neurônios, resultando em uma estimulação neuronal com sincronia, e estão associados ao processo de formação e consolidação da memória (Figura 7) (Izquierdo *et al.*, 2008, Katche, Cammarota e Medina, 2013).

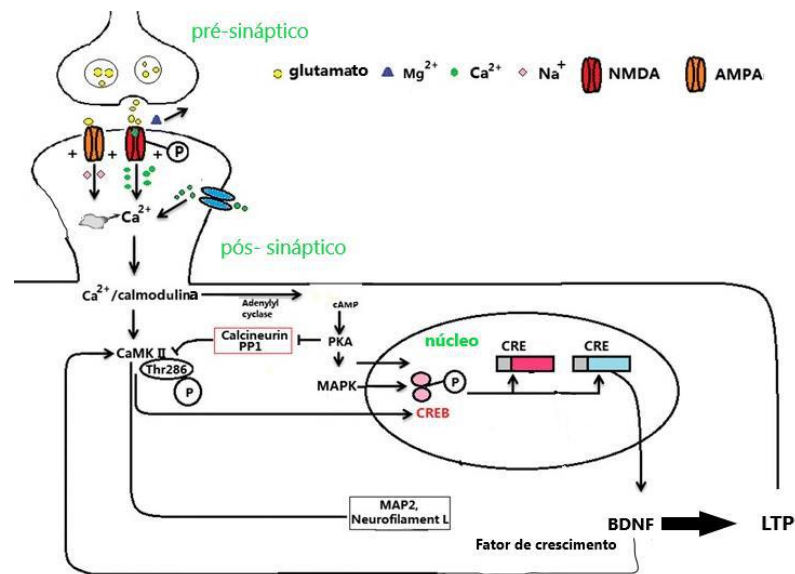


Figura 7. Via de sinalização glutamatérgica disparada no processo de formação e consolidação de memória. A liberação do glutamato pré-sináptico pode ativar o receptor NMDA pós-sináptico, levando à remoção de íons de magnésio e ao influxo de cálcio. O cálcio se liga à calmodulina para ativar a PKA e a PKC dependentes de calmodulina, que são a base para a ativação da MAPK. Além disso, a MAPK ativada pode ser transportada para o núcleo e ativar o fator transcripcional CREB, resultando na expressão de BDNF e de potenciais de longa-duração. (Fonte: ADAPTADO de Wang e Peng, 2016).

Estudos demonstraram que na EAS experimental, ocorre dano cognitivo nos animais submetidos ao procedimento de indução de sepse, evidenciado pela perda de memória, e que a produção de espécies reativas de oxigênio está envolvida neste processo (Schwalm *et al.*, 2014). Como já mencionado, o comprometimento neurocognitivo também têm sido associado com ativação de microglia e astrócitos em regiões cerebrais associadas à cognição e subsequente neuroinflamação (Tronel *et al.*, 2013). Segundo Reis e colaboradores (2017), estratégias terapêuticas baseadas no bloqueio ou diminuição do avanço neuroinflamatório observado durante a EAS experimental podem prevenir o dano cognitivo associado a doença. Dessa maneira, se torna fundamental entender minuciosamente os mecanismos envolvidos no

desenvolvimento da EAS e no dano cognitivo gerado, com a finalidade de sugerir novos alvos terapêuticos para a doença (Reis *et al.*, 2017).

Além disso, o declínio cognitivo e funcional observados em pacientes sobreviventes da sepse se relacionam diretamente com necessidade de cuidadores, internação em lar de idosos, depressão e mortalidade. Nos Estados Unidos, surgem cerca de 20.000 novos casos por ano de comprometimento cognitivo e consequente demência em idosos, e esses novos casos são atribuídos a episódios anteriores de sepse. Diferente de outras doenças neurológicas, o dano cognitivo proveniente da EAS pode ser parcialmente evitado com o diagnóstico e tratamento adequado, demonstrando a necessidade de um olhar mais preciso para essa doença. Assim, a sepse é um grande problema de saúde pública pouco reconhecido, devido sua alta taxa de mortalidade nas UTIs e por causa dos efeitos gerados em indivíduos sobreviventes, com implicações importantes nos pacientes, em suas famílias e também no sistema de saúde (Iwashyna *et al.*, 2010; Van Gool *et al.*, 2010; Michels *et al.*, 2015).

1.6 Vitamina E

A vitamina E é uma substância que possui alta atividade antioxidante, está relacionada com a síntese de hormônios e ao sistema reprodutor, podendo auxiliar na fertilidade, e dentre todas as vitaminas conhecidas, é a que está mais associada ao sistema nervoso central, pois sua deficiência pode causar a curto e longo prazo dificuldades neuromusculares, alterações na consciência e danos às células neuronais (Helmer *et al.*, 2003; Zaidi e Banu, 2004).

Por causa da sua função antioxidante, a vitamina E apresenta um papel essencial na proteção do organismo contra os efeitos deletérios causados por cenários de estresse oxidativo, neutralizando ou reduzindo as consequências prejudiciais de ROS. Dessa forma, a vitamina E é um dos principais mecanismos celulares de defesa antioxidante (Bitu-Moreno *et al.*, 2001).

A vitamina E não é produzida pelo organismo e por isso deve ser proveniente da dieta ou de suplementação, ela representa a principal vitamina lipossolúvel presente no plasma e existe em oito formas químicas diferentes, sendo elas a alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ) tocoferóis e α , β , γ e δ tocotrienóis. Dentre todas essas formas, o α -tocoferol é a forma biologicamente mais ativa e a mais estudada até então (Howard *et al.*, 2011).

Após sua ingestão, a vitamina E é absorvida na região superior do intestino delgado, processo que acontece com o auxílio dos sais biliares. Ao fim da sua absorção, a vitamina E percorre o organismo através do sistema linfático. Grande parte da vitamina E se concentra nos

enterócitos, mas outra parcela dessa molécula se dirige a sítios extra-hepáticos. A nível celular, a vitamina E se localiza na porção lipídica das membranas celulares (Cederberg *et al.*, 2001; Carlson *et al.*, 2016).

De forma mais detalhada, o α -tocoferol é capaz de inibir o processo de peroxidação lipídica, por meio da liberação de íons H^+ que neutralizam as ROS produzidas pelo organismo, evitando a degeneração lipídica dos fosfolípídeos membranares, degradação de proteínas e bases nitrogenadas do material genético, complicações essas que ocorreriam através da ação de ROS. Assim, a concentração de vitamina E em cada célula é proporcional a chance de prevenir a degradação das membranas celulares. Caso os danos nas membranas sejam muito severos, essas células podem morrer, resultando em uma lesão tecidual (Bitu-Moreno *et al.*, 2001; Helmer *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2011).

Dados da literatura demonstram que os danos oxidativos que ocorrem em células e tecidos estão diretamente relacionados com a fisiopatologia de diversas doenças, inclusive doenças neurológicas, como a DA, DP e EAS, que se caracterizam pelo quadro confusional, demência progressiva, perda de memória e alteração de funções cognitivas. Isso porque o contexto de estresse oxidativo, o acúmulo de radicais livres e a extensa peroxidação lipídica ocasiona a neurodegeneração. Assim, a vitamina E pode atuar na inibição desses danos através da sua ação antioxidante, sendo considerada uma eficiente alternativa terapêutica para tais patologias (Fariss e Zhang, 2003; Pahrudin Arrozi *et al.*, 2020).

Um estudo utilizou a vitamina E como terapia para a DP, considerando que o SNC possui uma elevada concentração de ácidos graxos poliinsaturados peroxidáveis, além de grande produção de ROS, e por isso, o tratamento com vitamina E parecia ser muito promissor. Esse grupo de pesquisadores constatou que uma suplementação crônica de vitamina E, possibilitou um aumento lento mas progressivo de α -tocoferol nas membranas celulares, evidenciando que a suplementação pode modular os níveis basais dessa substância, que são suficientes para reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo (Fariss e Zhang, 2003).

Além disso, Zang e colaboradores (2012) demonstraram que a administração de vitamina E na sepse experimental induzida através do modelo de infecção bacteriana injetável é eficiente, uma vez que esse tratamento é capaz de melhorar a capacidade antioxidante do organismo, diminuir a produção de H_2O_2 , reduzir a peroxidação lipídica e manter a integridade e funcionalidade da membrana mitocondrial, além de interferir na produção de citocinas inflamatórias que são produzidas de forma exacerbada durante a sepse (Zang *et al.*, 2012).

Uma vez que a vitamina E não se acumula rapidamente nos tecidos, pelo contrário, sua concentração nas células é limitada a quantidade suficiente para interromper a peroxidação

lipídica e neutralizar os radicais livres, dados da literatura afirmam que o tratamento com vitamina E para doenças que possuem a fisiopatologia ligada aos processos de estresse oxidativo, deve ser feito de forma preventiva, para que a administração crônica possa ser capaz de aumentar os níveis de vitamina E de maneira lenta mas contínua, resultando em uma concentração apropriada para proteger o organismo de tais patologias (Fariss e Zhang, 2003; Helmer *et al.*, 2003; Vijayaraghavan *et al.*, 2005; Pahrudin Arrozi *et al.*, 2020).

A partir de todo o exposto, é possível concluir que a vitamina E é capaz de diminuir a produção de radicais livres e reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo, assim como pode recuperar a função mitocondrial e atividade metabólica, e proteger as células contra a peroxidação lipídica, evitando a morte celular, lesão tecidual e consequente disfunção orgânica, além de interferir na produção de citocinas pró-inflamatórias e no processo neurodegenerativo (Zang *et al.*, 2012; Minter *et al.*, 2020). Tendo em vista todas as características dessa substância e sua relação com o sistema nervoso, o presente trabalho visa demonstrar os efeitos do tratamento adjuvante com vitamina E, associado a antibioticoterapia, como abordagem terapêutica para a prevenção e/ou reversão da EAS e sua seqüela cognitiva.

1.7 Modelos experimentais de sepse

Modelos animais são cruciais para os estudos de muitas doenças humanas, incluindo doenças infecciosas e a sepse (Druilhe, Hagan e Rook, 2002). Esses modelos são importantes para a descoberta de novos alvos terapêuticos e seus mecanismos de ação, e são necessários por causa da impossibilidade de realizar alguns procedimentos de pesquisa em humanos, por razões práticas e éticas (Basir *et al.*, 2012).

No entanto, é desafiador simular as mesmas condições geradas pela sepse em humanos em muitas espécies de animais utilizados em experimentos laboratoriais. Apesar disso, diferentes modelos animais foram desenvolvidos ao longo do tempo, devido a importância de estudar os mecanismos fisiopatológicos da sepse e testar novos medicamentos para o tratamento da mesma (Garrido *et al.*, 2004).

Os modelos experimentais desenvolvidos seguem diferentes estratégias, e as 3 principais são a administração de toxinas exógenas, como o LPS; administração de patógenos viáveis, como bactérias e vírus; e comprometimento da barreira protetora endógena do animal (Wichterman *et al.*, 1980; Fink e Heard, 1990). Todas essas abordagens experimentais possuem vantagens e desvantagens, e visam reproduzir as condições fisiopatológicas observadas em pacientes sépticos (Dejager *et al.*, 2011) (Quadro 2).

Quadro 2 – Comparação de vários modelos animais de sepse comumente usados (Fonte: ADAPTADO de Dejager *et al.*, 2011).

Modelo Experimental	Tipo	Vantagens	Desvantagens
Modelo de Endotoxemia	Injetável	<ul style="list-style-type: none"> • Simples e reproduzível • A resposta induzida é aguda • Modelo altamente controlado e padronizado 	<ul style="list-style-type: none"> • A sinalização mediada por LPS é estritamente dependente de TLR-4 • Não imita sepse humana em termos de perfil de citocinas • Variabilidade na dose, toxina e via de administração
Modelo de infecção bacteriana	Injetável	<ul style="list-style-type: none"> • A presença de bactérias permite percepções sobre os mecanismos de resposta do hospedeiro aos patógenos 	<ul style="list-style-type: none"> • O crescimento e a quantificação de bactérias são necessários antes da administração • O modelo de uma única bactéria não reflete a sepse humana • Variabilidade na carga bacteriana, via de administração e cepa bacteriana • Doses altas causam choque séptico
Peritonite por stent em colón ascendente (CASP)	Cirúrgico	<ul style="list-style-type: none"> • Polimicrobiano • Presença de foco de infecção 	<ul style="list-style-type: none"> • Cirurgicamente mais difícil • Comprimento do cólon não definido • Fase hemodinâmica menos caracterizada
Ligadura e punção cecal (CLP)	Cirúrgico	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimento simples • Presença de foco de infecção • Polimicrobiano • Modelo que mais mimetiza a sepse humana • Expressão de citocinas de forma semelhante aos humanos 	<ul style="list-style-type: none"> • Formação de abscessos • Variabilidade na gravidade devido às diferenças no procedimento experimental

O modelo CLP (*Cecal ligation puncture model of sepsis*) se caracteriza como um modelo de operação cirúrgica, onde o ceco do animal é exposto através de uma incisão

abdominal, e em seguida o órgão é ligado com uma linha de sutura abaixo da válvula ileocecal, e perfurado por meio de punções feitas com agulha de punção venosa. O conteúdo cecal é então extravasado para a cavidade abdominal, de modo a induzir a peritonite (Figura 8) (Garrido *et al.*, 2004; Dejager *et al.*, 2011).

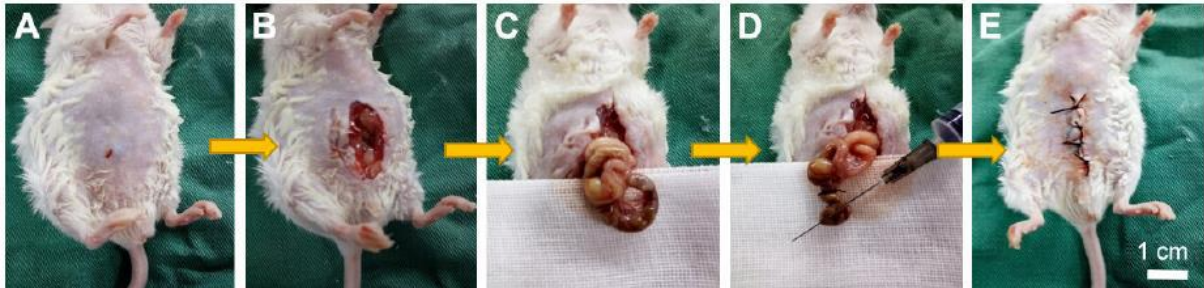


Figura 8. Operação cirúrgica do modelo CLP. Os animais são submetidos a uma incisão de cerca de dois centímetros no abdômen, abrangendo a pele e o peritônio. O ceco é exposto e isolado, e uma ligadura é feita abaixo da válvula ileocecal. Feita a ligadura, o ceco é perfurado com agulha de punção venosa, em um ângulo de inclinação, e pressionado para o extravasamento de conteúdo cecal na cavidade abdominal, e por fim, é recolocado no abdômen. A incisão é fechada com fio de sutura em dois planos, peritônio e pele, respectivamente. (Fonte: Liu *et al.*, 2018).

Na técnica de CLP, a barreira protetora endógena do animal, que mantém o compartimento estéril dentro do copo, é alterada de modo a resultar na inflamação sistêmica ocasionada pela manifestação do quadro séptico. Isso ocorre pois o intestino abriga muitas espécies bacterianas, que estão devidamente restritas ao órgão pelo epitélio intestinal, e uma das agressões que acontece no modelo CLP, é justamente a ruptura dessa barreira, permitindo a translocação bacteriana para a corrente sanguínea (Goldim, 2018). Dessa forma, a microbiota intestinal consegue invadir sítios que antes se encontravam estéreis, provocando uma alta resposta imune. A cirurgia do método CLP ainda causa um trauma de tecido que ocorre devido a laparotomia, além da necrose causada pela ligadura cecal (Dejager *et al.*, 2011).

A grande vantagem do CLP com relação aos demais modelos, é que os patógenos responsáveis por induzir a sepse são patógenos endógenos, o que simula uma das causas de desenvolvimento de sepse em humanos, a peritonite (Garrido *et al.*, 2004). Devido as características do modelo experimental, que incluem o procedimento simples, o foco infeccioso localizado e a infecção polimicrobiana, a técnica CLP se tornou um método muito utilizado nos estudos de sepse, e é considerado atualmente como uma das melhores representações da sepse humana, sendo estabelecido como modelo padrão-ouro de sepse. A utilização desse modelo tem trazido contribuições importantes no que diz respeito a novas estratégias terapêuticas para um grande problema de saúde pública (Verma, 2016; Liu *et al.*, 2018).

Além disso, esse modelo experimental exhibe deficiências neurológicas e comportamentais semelhantes às encontradas em humanos que desenvolvem a sepse, incluindo ataxia, edema cerebral, aumento da produção de citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e desenvolvimento de dano cognitivo em longo prazo (Barichello *et al.*, 2005; Chavan *et al.*, 2012; Petronilho *et al.*, 2012; Michels *et al.*, 2015).

Sendo assim, a hipótese do presente estudo se baseia na prevenção dos danos causados pela sepse experimental, induzida através do modelo CLP, e sua seqüela cognitiva, devido ao tratamento adjuvante com vitamina E.

2. Justificativa

A sepse é responsável por causar mais de 600.000 casos por ano no Brasil, caracterizando a principal causa de mortes em UTIs, e o número de hospitalizações devido a doença tem aumentado significativamente no decorrer dos últimos anos. Além disso, seqüelas em diversos sistemas do organismo, inclusive seqüelas neurológicas, são comuns após a sepse, podem ser permanentes e estão associadas com a diminuição da qualidade de vida e da capacidade de trabalho. A mortalidade de pacientes com formas graves de sepse excede 50%, e frequentemente os sobreviventes apresentam seqüelas de longo prazo, como déficits cognitivos e motores, que podem ser irreversíveis. Estes dados refletem a ausência de terapias eficientes para a sepse. Sem uma melhora na estratégia de tratamento estes números tendem a aumentar devido ao envelhecimento da população, o surgimento de patógenos resistentes, procedimentos cirúrgicos mais complexos e o aumento do contingente de pacientes imunossuprimidos.

Os mecanismos responsáveis pela alteração do estado mental durante a inflamação periférica e sistêmica ainda não são bem compreendidos. Sendo assim, é indispensável a realização de estudos que visem o melhor entendimento destas doenças, de modo a subsidiar o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e alvos terapêuticos mais eficazes para estas condições patológicas frequentes e de elevada morbi-mortalidade.

Nesse contexto, o potencial de substâncias anti-inflamatórias ou moduladoras da resposta imune como estratégias para controlar a neuroinflamação e suas conseqüências em pacientes com sepse deve ser explorado com urgência. No presente trabalho utilizamos a vitamina E, que possui alta atividade antioxidante, de forma a conter o desenvolvimento da EAS e sua seqüela cognitiva. Além disso, é fundamental analisar os efeitos do tratamento com vitamina E, pois essa seria uma excelente estratégia terapêutica a ser adotada, já que essa

substância possui eficácia comprovada em outros modelos experimentais e é de fácil acesso a população, possibilitando uma maior adesão dos pacientes.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso do tratamento adjuvante de vitamina E como estratégia terapêutica para a prevenção do modelo experimental de EAS e sua sequela cognitiva.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do tratamento adjuvante de vitamina E na progressão da sepse experimental;
- Avaliar o efeito do tratamento com vitamina E na neuroinflamação, através de alterações no perfil de citocinas (TNF- α e IL-10) e proteínas associadas a fisiologia do SNC (S100 β);
- Avaliar o efeito do tratamento com vitamina E na expressão de marcadores de estresse oxidativo (3-Nitro e 4-HNE);
- Avaliar o efeito do tratamento com Vitamina E na perda cognitiva por meio de análise comportamental em modelo de memória aversiva (*Freezing*).

4. Materiais e Métodos

4.1 Modelo experimental de sepse

Para o modelo de sepse experimental foram utilizados camundongos Swiss Webster com 4 a 8 semanas de idade, que foram fornecidos pelo Biotério Central da FIOCRUZ/ICTB sob licença CEUA L005/20. Durante os experimentos, os animais foram mantidos no Centro de Experimentação Animal do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira (HPP), pertencente ao Instituto Oswaldo Cruz. Os animais foram alocados em gaiolas plásticas de microisoladores ventilados,

em temperatura ambiente, com livre acesso à ração e água e em ciclo claro/escuro de 12/12 horas. O modelo experimental utilizado no presente trabalho é o de Indução de Sepse por Ligadura e Punção Cecal (CLP) e consiste em, realizar assepsia e anestesia dos camundongos, onde o álcool foi usado como um agente esterilizante e aplicado na região abdominal dos animais, e os mesmos foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de ketamina (100 mg por kg de peso corporal) e xilazina (10 mg por kg de peso corporal). Em seguida, os animais foram submetidos a uma incisão de cerca de dois centímetros no abdômen, abrangendo a pele e o peritônio. O ceco foi exposto e isolado cautelosamente, e uma ligadura foi feita abaixo da válvula ileocecal, com o objetivo de obstruir a circulação entre o intestino delgado e intestino grosso. Feita a ligadura, o ceco foi perfurado com agulha de punção venosa (21-gauge), quatro vezes, em um ângulo de inclinação, e pressionado para o extravasamento de conteúdo cecal na cavidade abdominal, e por fim, foi recolocado no abdômen. A incisão então foi fechada com fio de sutura em dois planos, peritônio e pele, respectivamente. O grupo SHAM foi sujeito ao mesmo procedimento de assepsia, anestesia, incisão e exposição do ceco, porém, o órgão não sofreu ligadura e não houve perfuração e extravasamento de conteúdo fecal. Após a exposição, o órgão foi recolocado na cavidade abdominal e a mesma foi suturada. Ao final do procedimento cirúrgico, todos os animais receberam reposição volêmica via subcutânea com 0,5 ml de salina estéril (Araújo *et al.*, 2012).

4.2 Desenho Experimental

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: Grupo SHAM, onde os animais não foram submetidos a indução de sepse; Grupo CLP, onde os animais foram submetidos a indução de sepse via CLP e receberam apenas veículo (DMSO 1%, 200 µl, v.o); Grupo CLP + Vit E, onde os animais foram submetidos a indução de sepse via CLP e foram tratados com vitamina E (100 mg/kg p.c.) via oral, 1 hora antes da indução de sepse experimental, 6, 24 e 48 horas após a indução de sepse. Todos os grupos experimentais (SHAM, CLP, CLP + Vit E) foram tratados com antibiótico Meropenem (10mg/kg) diluído em 0,2 ml de salina, via subcutânea, nos tempos de 6, 24 e 48 horas pós-CLP.

Para as análises bioquímicas, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6 ou 24 horas após o último tratamento com antibiótico e Vitamina E, e foram extraídas amostras de soro e do tecido cerebral. Para os testes cognitivos, um outro grupo de animais divididos nos mesmos grupos experimentais e sob mesmo esquema de tratamento, seguiram para avaliação

cognitiva realizada a partir do décimo quinto dia após a indução de sepse através do modelo CLP.

4.3 Curva de sobrevida e avaliação de escore clínico

Um grupo de animais, divididos nos grupos experimentais CLP e CLP + Vit E, sob mesmo esquema de tratamento, foi monitorado diariamente, durante 96 horas, para avaliação do efeito da vitamina E na mortalidade dos animais submetidos a indução de sepse experimental, com a finalidade de se obter uma curva de sobrevida.

Além disso, um outro grupo de animais divididos nos mesmos grupos experimentais e sob mesmo esquema de tratamento, após 24 horas da indução de sepse pelo método CLP, teve a evolução da doença analisada clinicamente pelo escore de gravidade de sepse, baseado no protocolo SHIRPA (*SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College and Royal London Hospital Phenotype Assessment*) (Rogers *et al.*, 1997). Neste teste os animais foram avaliados de acordo com 12 parâmetros clínicos: piloereção; abdômen contraído; alteração de fezes; perda de tônus corporal; lacrimação; fechamento de pálpebras; atividade locomotora; alteração de temperatura corporal; alerta (escape ao toque); interesse pelo ambiente; força ao agarrar e taxa de respiração. Na presença do sinal clínico foi dada a pontuação um e na ausência, zero. O controle também foi colocado em teste de modo a confirmar a ausência de interferências externas no experimento. Os animais que obtiveram somatório entre 3 e 8, são considerados acometidos com sepse, enquanto que aqueles que obtiveram somatório entre 9 e 12 são considerados acometidos com choque séptico (Reis *et al.*, 2016).

4.4 Coleta de amostras

4.4.1 Sangue

Os camundongos da linhagem Swiss Webster, incluindo todos os grupos experimentais, foram anestesiados pela via inalatória com Isoflurano (5%) e as amostras de sangue foram coletadas por via ocular. O sangue foi centrifugado a 2500 rpm em centrífuga clínica por 10 minutos, e em seguida o soro foi coletado para análises dos níveis da citocina anti-inflamatória, IL-10, e da proteína associada ao SNC, S100 β , através do ensaio de imun absorção ligado à enzima (ELISA).

4.4.2 Tecido Cerebral

Após à coleta de sangue, foi realizada a perfusão dos animais em estudo com solução salina (NaCl 0,9 %) e, em seguida, foi feita a abertura do crânio para a remoção do tecido cerebral dos animais. Estes cérebros foram coletados, divididos em hemisférios e foram colocados dentro de tubos para criopreservação e estocados no freezer -80°C. O material armazenado foi posteriormente utilizado para avaliações dos níveis das citocinas IL-10 e TNF- α e das moléculas descritas como marcadores de estresse oxidativo, 3-Nitrotirosina e 4-HNE, através do ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA) e do ensaio de Dot Blot, respectivamente.

4.5 Dosagem de proteínas (BCA)

As amostras de tecido cerebral foram extraídas após a perfusão dos animais e homogeneizadas em tampão apropriado para a análise em questão. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método BCA (Pierce, Thermo Scientific, EUA). O reagente de trabalho foi preparado adicionando-se cinquenta partes de Reagente BCA A e uma parte de Reagente BCA B. Uma curva padrão (de 0,01562 a 2 mg/mL) foi construída através de diluições seriadas a partir de albumina humana fornecida pelo fabricante.

As amostras totais homogeneizadas foram diluídas 10 vezes numa solução de PBS, de modo que 10 μ L de cada amostra foi adicionado em 90 μ L de PBS. Em seguida, 10 μ L das amostras que já foram diluídas são pipetadas em placas de 96 poços de fundo chato e, posteriormente, adicionados 190 μ L do reagente descrito acima. A placa foi incubada em estufa a 37°C por trinta minutos, e após isso a placa passou por uma leitura no espectrofotômetro, sob o comprimento de onda de 562 nm.

4.6 Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA)

Para analisar a resposta inflamatória, foram dosados os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 e da citocina pró-inflamatória TNF- α , e para avaliar o processo neurodegenerativo, foi dosado o nível da proteína associada à fisiologia do SNC, S100 β , em amostras de soro e tecido cerebral dos diferentes grupos experimentais, pelo kit R&D dual set. Para isso, foram utilizadas placas de fundo chato para ensaio em volume reduzido, que foram cobertas com o anticorpo de captura diluído em PBS (50 μ L/poço). Após incubação por 16

horas a 4°C, as placas foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem (PBS Tween® 0,05%) (100µL/poço) e incubadas durante uma hora com a tampão de bloqueio (PBS com 1% de albumina sérica bovina-BSA) (100 µL/poço) (Sigma Aldrich). A curva padrão foi diluída em tampão de bloqueio + Tween® (0,05%) e aplicada na placa, bem como as amostras (50 µL/poço). Após nova incubação por 16 horas a 4°C as placas foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem e o anticorpo de detecção diluído em tampão de bloqueio + Tween® (0,05%) (50 µL/poço) foi adicionado. Uma hora após a incubação com o anticorpo de detecção, as placas foram lavadas 6 vezes com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de streptavidina-peroxidase (R&D dual set) (50 µL/poço). Trinta minutos após a incubação no escuro, as placas foram lavadas 8 vezes com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma Aldrich), substrato para a reação colorimétrica. Após desenvolvimento satisfatório de cor na curva-padrão, a reação foi interrompida com solução de H₂SO₄ 0,4N (50 µL/poço) e foi realizada a leitura da placa no espectrofotômetro, sob o comprimento de onda de 405nm.

4.7 Ensaio de Dot Blot

Para avaliar a expressão de marcadores de estresse oxidativo, 3-Nitrotirosina e 4-HNE, amostras de tecido cerebral foram submetidas a dosagem de proteínas através do método BCA seguido pelo ensaio de Dot Blot. Após a dosagem, as amostras foram preparadas para o ensaio por meio da diluição em água Milli-Q, de modo que a concentração final de proteínas em cada poço da placa fosse igual a 10 µg/100µl. O ensaio de Dot Blot foi realizado com o auxílio do aparato *Bio-Dot® Microfiltration Apparatus (Bio-Rad)* com 96 poços, seguindo as orientações contidas no manual do fabricante. Para a avaliação dos subprodutos da peroxidação lipídica, foram utilizados os anticorpos anti-Nitrotirosina 3 (1:500, Abcam) e anti-4-HNE (1:1000, Abcam). De modo a normalizar as análises, foi utilizado o anticorpo primário anti-actina (1:10.000, Abcam). As proteínas de interesse foram identificadas pela incubação da membrana por meia hora, com os anticorpos secundários *anti-mouse* (Li-Cor, Biociences) diluídos em TBS Tween. As membranas foram escaneadas e a detecção dos dots foi feita através da densitometria com auxílio do software *Odyssey Infrared Imaging system*.

4.8 Avaliação cognitiva

4.8.1 *Freezing*

O ensaio de *Freezing* foi realizado no 15º e 16º dias após o CLP, para analisar os danos na capacidade cognitiva associados à formação de memória aversiva. Este ensaio comportamental foi realizado em 2 sessões: na sessão treino, os animais foram colocados na caixa de experimentação por 3 minutos com livre exploração, e, após esse tempo, receberam dois choques de 0,6 mA por 3 segundos (intervalo de 30 s). Na sessão teste, 24 horas após a sessão treino, os camundongos voltaram a caixa experimental sem receber choque e, foi observado o tempo em que os animais ficaram parados mediante a iminência de um possível choque (Bekinschtein *et al.*, 2007). Quanto menos tempo o animal permaneceu imóvel, maior foi sua perda de memória, significando que ele não se recorda do choque a qual foi submetido na sessão treino.

4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados através do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, inc.). Para a realização das análises estatísticas, foram realizadas: análises descritivas de média, desvio-padrão, erro padrão da média (variação interquartil, quando aplicável). Para análise da mortalidade foi utilizado o teste Log-Rank-Mantel Cox. Para dados de escore clínico foi utilizado o teste T de Student. Já para os dados do modelo de *Freezing*, ELISA e ensaio de Dot Blot, as análises foram feitas por ANOVA seguido do teste de Tukey. Em todas as análises, foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$ ou menos.

5. Resultados

5.1 O tratamento prolongado com Vitamina E reduziu a mortalidade e alterou o escore clínico de animais submetidos a sepse experimental

No presente estudo, o modelo experimental de sepse em camundongos machos Swiss Webster foi utilizado para analisar o impacto do tratamento adjuvante de vitamina E na progressão da sepse experimental e sua seqüela cognitiva. Para isso, os animais foram divididos nos grupos SHAM, grupo controle falso operado; grupo CLP, animais que tiveram indução de sepse experimental através do modelo CLP; e grupo CLP + Vit E, animais que tiveram indução de sepse experimental através do modelo CLP e foram tratados com vitamina E (100mg/kg via oral) nos tempos de 1 hora antes do procedimento de CLP, 6, 24 e 48 horas após o CLP. Todos os animais dos diferentes grupos experimentais foram tratados com antibiótico Meropenem (10mg/kg via subcutânea) nos tempos de 6, 24 e 48 horas após a cirurgia.

Um grupo de camundongos, divididos nos grupos experimentais CLP e CLP + Vit E, sob mesmo esquema de tratamento, foi monitorado diariamente, durante 96 horas, para avaliação do efeito do tratamento na mortalidade dos animais submetidos a indução de sepse experimental, com a finalidade de se obter uma curva de sobrevivência. A Figura 9 demonstra que o tratamento com vitamina E reduziu significativamente a mortalidade dos animais tratados, ao longo de 96 horas após a indução de sepse experimental, quando comparado ao grupo CLP. No tempo de 96 horas após a indução de sepse experimental, o tratamento adjuvante com vitamina E foi capaz de conservar cerca de 70% da sobrevivência dos animais, enquanto apenas 25% dos animais pertencentes ao grupo CLP sobreviveram.

Além disso, um outro grupo de animais divididos nos mesmos grupos experimentais e sob mesmo esquema de tratamento, após 24 horas da indução de sepse pelo método CLP, foi avaliado através de um escore clínico constituído por 12 parâmetros: piloereção; abdômen contraído; alteração de fezes; perda de tônus corporal; lacrimação; fechamento de pálpebras; atividade locomotora; alteração de temperatura corporal; alerta (escape ao toque); interesse pelo ambiente; força ao agarrar e taxa de respiração. Na presença do sintoma foi dada a pontuação um e na ausência, zero. A Figura 10 mostra que o tratamento com vitamina E alterou significativamente o valor obtido através do Escore Clínico feito em 24 horas após a indução de sepse experimental, entre os grupos controle, tratados e não tratados. O tratamento com vitamina E não impediu o desenvolvimento do quadro séptico, mas impactou diretamente na pontuação que os animais obtiveram através do escore clínico, uma vez que o

grupo tratado obteve somatórios significativamente menores quando comparados ao grupo CLP. Ainda foi possível observar que nenhum animal do grupo CLP + Vit E foi acometido com choque séptico, o que não foi possível observar no grupo CLP, onde 2 animais foram acometidos com choque séptico.

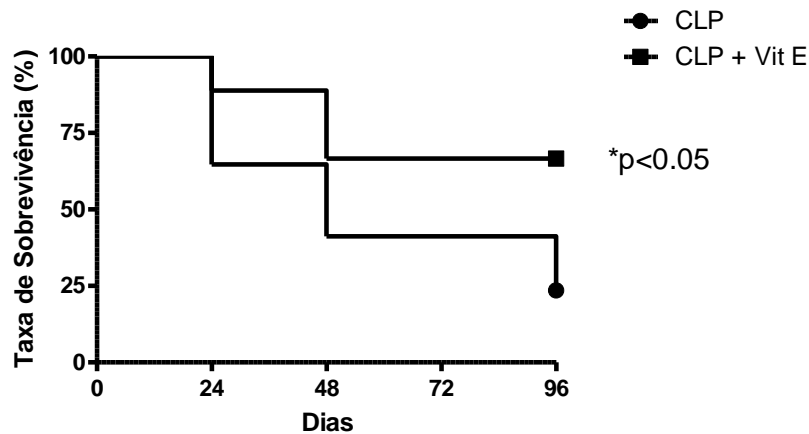


Figura 9. Avaliação da curva de sobrevida dos camundongos Swiss Webster após a indução de sepse experimental via CLP tratados ou não com vitamina E (CLP + Vit E 100 mg/kg). Camundongos machos Swiss Webster foram submetidos a indução de sepse experimental via CLP e foram tratados com veículo (CLP) ou tratados com vitamina E a 100 mg/kg v.o. (CLP + Vit E), em conjunto com o antibiótico Meropenem (10mg/kg v.s.). O tratamento perdurou até 48 horas após a indução de sepse e a curva de sobrevida foi observada ao decorrer de 96 horas após a indução de sepse experimental, n=10-15/grupo. Log-rank (Mantel-Cox) e Gehan-Breslow-Wilcoxon (C).

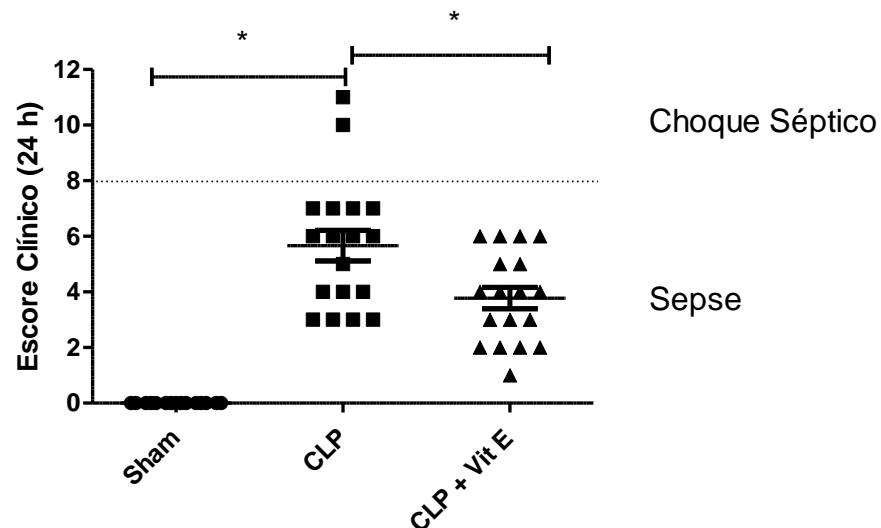


Figura 10. Avaliação do escore clínico dos camundongos Swiss Webster não submetidos a indução de sepse (SHAM) e submetidos a indução de sepse experimental via CLP tratados ou não com vitamina E (CLP + Vit E 100 mg/kg). Camundongos machos Swiss Webster foram submetidos a indução de sepse experimental via CLP e foram tratados com veículo (CLP) ou tratados com vitamina E a 100 mg/kg v.o. (CLP + Vit E), em conjunto com o antibiótico Meropenem (10mg/kg v.s.). Os sinais clínicos que caracterizam o estabelecimento de sepse experimental foram avaliados após 24 horas do procedimento cirúrgico. O grupo controle SHAM também foi colocado em teste de modo a confirmar a ausência de interferências externas no experimento, n=21-24/grupo. *p<0,05. One-Way ANOVA (Tukey Multiple Comparison test).

5.2 O tratamento com Vitamina E reduziu a produção de TNF- α em amostras de tecido cerebral 6 horas após a indução de sepse experimental

Sabe-se que a fase aguda da sepse, com alta produção de citocinas pró-inflamatórias, desempenha um papel muito importante na fisiopatologia da doença, uma vez que essa resposta inicial contra o agente etiológico que estabeleceu a sepse é essencial. Porém, essa tempestade de citocinas também propicia injúrias teciduais e principalmente favorece o desenvolvimento da neuroinflamação. Dessa forma, para avaliar o impacto do tratamento com vitamina E no processo de neuroinflamação, foram analisados os níveis TNF- α , uma citocina pró-inflamatória considerada uma das principais moléculas relacionadas a quadros inflamatórios e altamente associada ao quadro séptico.

Os animais pertencentes aos grupos experimentais foram eutanasiados após 6 horas da indução de sepse e amostras de tecido cerebral foram recolhidas e avaliadas através da técnica de ELISA previamente estabelecida pelo grupo de pesquisa. A análise do tecido cerebral (Figura 11), demonstrou que os níveis de TNF- α do grupo CLP estavam significativamente maiores quando comparado ao grupo SHAM, e que os níveis de TNF- α no grupo CLP + Vit E foram significativamente menores quando comparados ao grupo CLP, se assemelhando aos valores encontrados no grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos SHAM e CLP + Vit E.

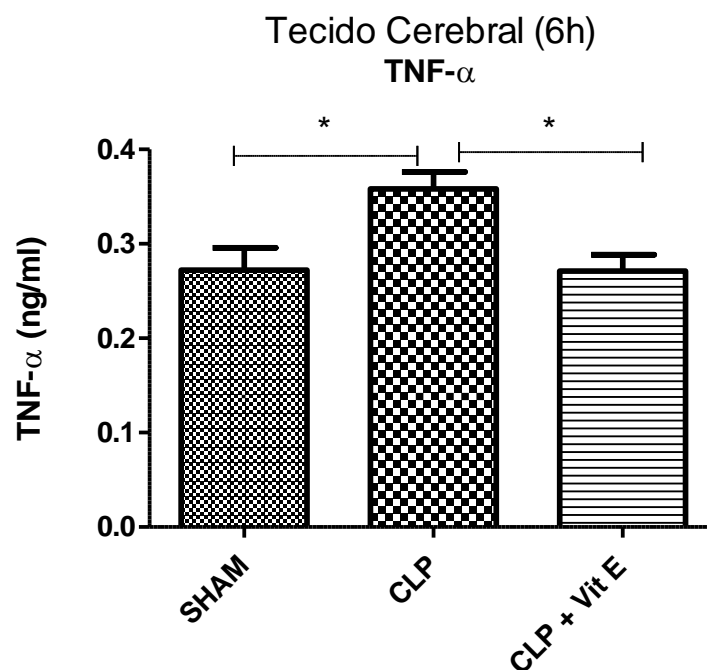


Figura 11. Avaliação da produção da citocina pró-inflamatória TNF- α em camundongos Swiss Webster não submetidos a indução de sepse (SHAM) e submetidos a indução de sepse experimental via CLP tratados ou

não com vitamina E (CLP + Vit E 100 mg/kg). Camundongos machos Swiss Webster foram submetidos a indução de sepse experimental via CLP e foram tratados com veículo (CLP) ou tratados com vitamina E a 100 mg/kg v.o. (CLP + Vit E), em conjunto com o antibiótico Meropenem (10mg/kg v.s.). O tratamento foi feito 1 hora antes da indução de sepse via CLP e 6 horas após o CLP. No tempo de 6 horas, amostras do tecido cerebral foram recolhidas e a produção de TNF- α foi avaliada por ELISA. Os níveis de TNF- α também foram analisados no grupo controle SHAM, onde não houve indução de sepse nem tratamento com Vit E, n=6/grupo. *p<0,05. One-Way ANOVA (Tukey Multiple Comparison test).

5.3 O tratamento com Vitamina E interferiu nos níveis de IL-10 em amostras de soro e tecido cerebral 6 horas após a indução de sepse experimental

De forma semelhante à análise anterior, também foram avaliados os níveis de IL-10, uma das principais citocinas com caráter anti-inflamatório, que induz a imunossupressão e que é produzida em altas concentrações na fase hipo-inflamatória da sepse, uma fase que visa conter os danos causados pela resposta inflamatória exacerbada, característica da doença. Assim, sua produção foi avaliada, de forma a observar o efeito do tratamento com vitamina E no processo de neuroinflamação por meio de alterações no perfil de citocinas.

Os animais pertencentes aos grupos experimentais foram eutanasiados após 6 horas da indução de sepse e amostras de soro e tecido cerebral foram recolhidas e avaliadas através da técnica de ELISA previamente estabelecida pelo grupo de pesquisa. A análise do soro (Figura 12A) mostrou que, os níveis de IL-10 do grupo CLP estavam significativamente maiores quando comparado ao grupo SHAM, e não havia diferença significativa entre as taxas de IL-10 nos grupos CLP e CLP + Vit E, apesar da tendência de que no grupo CLP + Vit E os níveis de IL-10 estejam mais baixos, se aproximando do valor obtido no grupo SHAM (Figura 12).

A análise do tecido cerebral (Figura 12B) por sua vez, revelou que os níveis de IL-10 do grupo CLP estavam significativamente maiores quando comparado ao grupo SHAM, e que os níveis de IL-10 no grupo CLP + Vit E foram significativamente menores quando comparados ao grupo CLP. Não houve diferença significativa entre os grupos SHAM e CLP + Vit E.

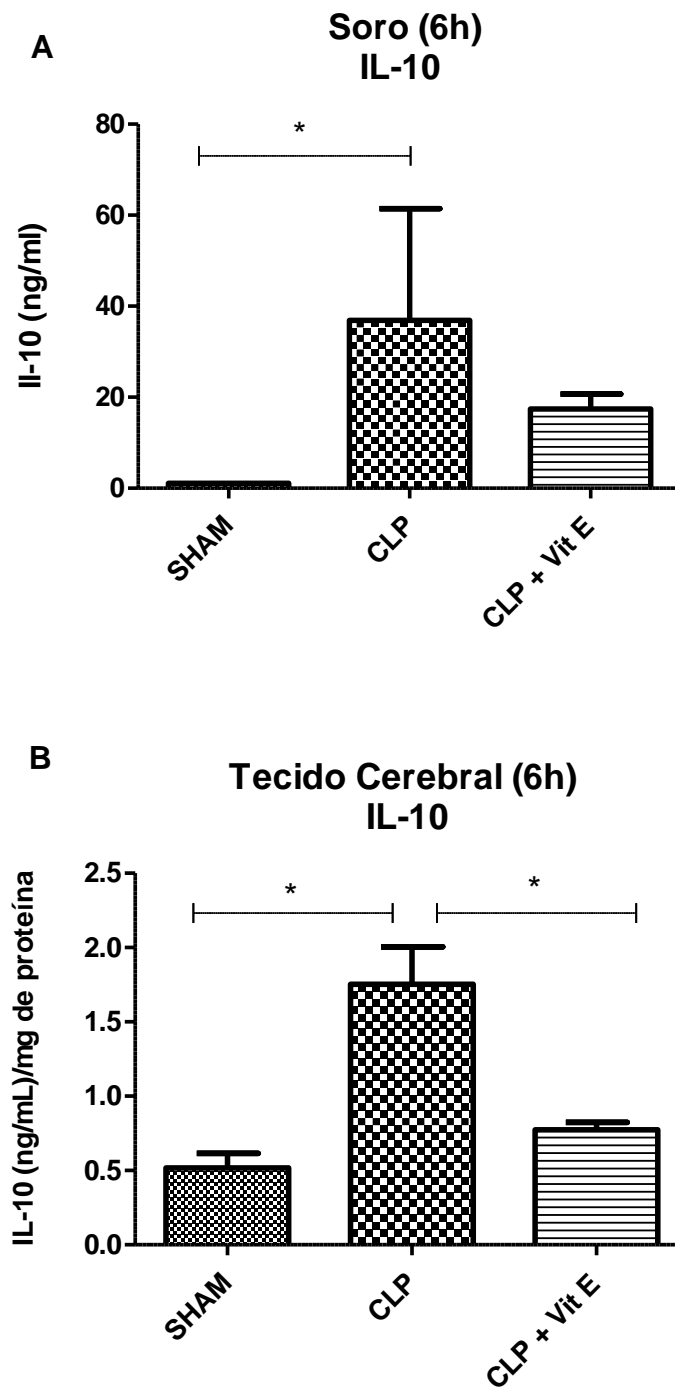


Figura 12. Avaliação da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em camundongos Swiss Webster não submetidos a indução de sepse (SHAM) e submetidos a indução de sepse experimental via CLP tratados ou não com vitamina E (CLP + Vit E 100 mg/kg). Camundongos machos Swiss Webster foram submetidos a indução de sepse experimental via CLP e foram tratados com veículo (CLP) ou tratados com vitamina E a 100 mg/kg v.o. (CLP + Vit E), em conjunto com o antibiótico Meropenem (10mg/kg v.s.). O tratamento foi feito 1 hora antes da indução de sepse via CLP e 6 horas após o CLP. No tempo de 6 horas, amostras de soro (**11A**) e do tecido cerebral (**11B**) foram recolhidas e a produção de IL-10 foi avaliada por ELISA. Os níveis de IL-10 também foram analisados no grupo controle SHAM, onde não houve indução de sepse nem tratamento com Vit E, n=6/grupo. *p<0,05. One-Way ANOVA (Tukey Multiple Comparison test).

5.4 A administração de Vitamina E não alterou os níveis de S100 β em amostras de soro 6 horas após a indução de sepse experimental

De modo a avaliar o efeito do tratamento com vitamina E no processo de neuroinflamação, foram analisados os níveis de S100 β nos diferentes grupos experimentais, uma proteína de ligação ao cálcio que está associada à fisiologia do SNC, que é expressa principalmente por astrócitos, tendo papel fundamental durante o desenvolvimento do SNC, pois pode atuar como fator neurotrófico e como proteína de sobrevivência neuronal. A S100 β é ainda considerada como um marcador de reatividade glial, pois sua secreção é aumentada durante processos neurodegenerativos.

Os animais pertencentes aos grupos experimentais foram eutanasiados após 6 horas da indução de sepse e amostras de soro foram recolhidas e avaliadas através da técnica de ELISA previamente estabelecida pelo grupo de pesquisa. Como resultado da avaliação (Figura 13), não foi possível observar diferença significativa nos níveis de S100 β entre os grupos, porém, existe uma tendência de que no grupo CLP haja maior secreção de S100 β pelas células neuronais, devido a uma lesão proveniente da EAS, e com isso os níveis de S100 β estejam mais altos no soro. Em contrapartida, no grupo CLP + Vit E, existe uma redução do nível sérico de S100 β , se assemelhando aos níveis encontrados no grupo SHAM, indicando que o tratamento com vitamina E possivelmente diminuiu os danos no tecido nervoso, impedindo assim a liberação de S100 β no meio extracelular e na corrente sanguínea.

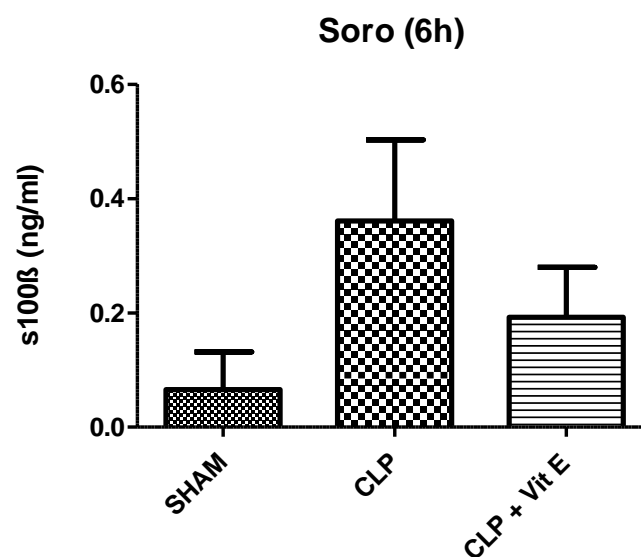


Figura 13. Avaliação da produção de S100 β em camundongos Swiss Webster não submetidos a indução de sepse (SHAM) e submetidos a indução de sepse experimental via CLP tratados ou não com vitamina E (CLP

+ **Vit E 100 mg/kg**). Camundongos machos Swiss Webster foram submetidos a indução de sepse experimental via CLP e foram tratados com veículo (CLP) ou tratados com vitamina E a 100 mg/kg v.o. (CLP + Vit E), em conjunto com o antibiótico Meropenem (10mg/kg v.s.). O tratamento foi feito 1 hora antes da indução de sepse via CLP e 6 horas após o CLP. No tempo de 6 horas, amostras de soro foram recolhidas e a produção de S100 β foi avaliada por ELISA. Os níveis de S100 β também foram analisados no grupo controle SHAM, onde não houve indução de sepse nem tratamento com Vit E, n=6/grupo. *p<0,05. One-Way ANOVA (Tukey Multiple Comparison test).

5.5 O tratamento com Vitamina E reduziu a produção de 3-Nitrotirosina e 4-hidroxi-2-nonenal em amostras de tecido cerebral 6 horas após a indução de sepse experimental

Para avaliar o efeito do tratamento com vitamina E no evento de estresse oxidativo que está fortemente associado ao processo de neuroinflamação que ocorre durante a sepse, os níveis de 3-Nitrotirosina (3-Nitro) e 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) foram analisados. Essas são moléculas resultantes da nitrosilação de proteínas e da peroxidação lipídica, respectivamente, e são consideradas marcadores de estresse oxidativo, sendo frequentemente produzidas em maior quantidade durante o desenvolvimento da EAS. Seus níveis foram medidos no tecido cerebral dos diferentes grupos experimentais através do ensaio de Dot Blot.

Os animais pertencentes aos grupos experimentais foram eutanasiados após 6 horas da indução de sepse e amostras de tecido cerebral foram recolhidas e analisadas através da técnica de Dot Blot previamente estabelecida pelo grupo de pesquisa. A análise do tecido cerebral (Figura 14A) mostrou que, a concentração de 3-Nitro no grupo CLP estavam significativamente maiores quando comparado ao grupo SHAM, e que os níveis de 3-Nitro no grupo CLP + Vit E foram significativamente menores quando comparados ao grupo CLP. Não houve diferença significativa entre os grupos SHAM e CLP + Vit E.

De forma semelhante, os níveis de 4-HNE do grupo CLP estavam significativamente maiores quando comparado ao grupo SHAM, e os níveis de 4-HNE no grupo CLP + Vit E foram significativamente menores quando comparados ao grupo CLP. Não houve diferença significativa entre os grupos SHAM e CLP + Vit E (Figura 14B).

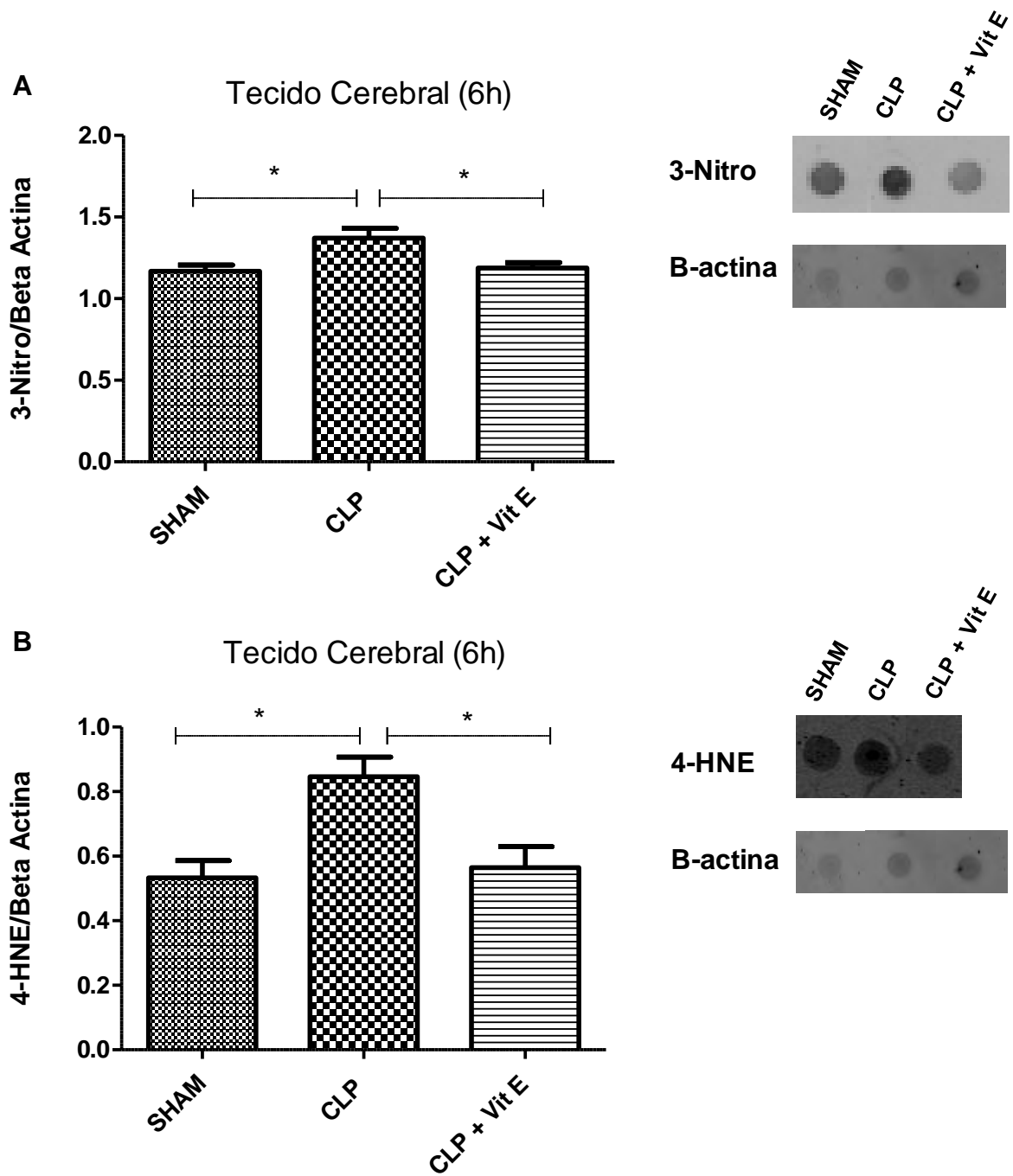


Figura 14. Avaliação da produção de 3-Nitro e 4-HNE em camundongos Swiss Webster não submetidos a indução de sepse (SHAM) e submetidos a indução de sepse experimental via CLP tratados ou não com vitamina E (CLP + Vit E 100 mg/kg). Camundongos machos Swiss Webster foram submetidos a indução de sepse experimental via CLP e foram tratados com veículo (CLP) ou tratados com vitamina E a 100 mg/kg v.o. (CLP + Vit E), em conjunto com o antibiótico Meropenem (10mg/kg v.s.). O tratamento foi feito 1 hora antes da indução de sepse via CLP e 6 horas após o CLP. No tempo de 6 horas, amostras do tecido cerebral foram recolhidas e a produção de 3-Nitro (**13A**) e 4-HNE (**13B**) foi avaliada por Dot Blot. Os níveis de 3-Nitro e 4-HNE também foram analisados no grupo controle SHAM, onde não houve indução de sepse nem tratamento com Vit E, n=5-7/grupo. * $p < 0,05$. One-Way ANOVA (Tukey Multiple Comparison test).

5.6 A administração de Vitamina E preveniu a formação do dano cognitivo em camundongos com sepse experimental induzida

Os danos causados ao tecido cerebral provenientes de eventos inflamatórios que acontecem durante o desenvolvimento da EAS acabam por resultar em sequelas cognitivas, que podem ser reversíveis ou irreversíveis. Assim, para avaliar o efeito do tratamento adjuvante de vitamina E no comprometimento cognitivo após a EAS, no 15º e 16º dias pós-CLP, os animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais foram submetidos ao ensaio comportamental de memória aversiva e contextual, *Freezing*. Após o teste, os animais foram eutanasiados.

A Figura 15 apresenta o resultado obtido a partir dos experimentos de *Freezing*. Após a contagem do tempo de imobilidade dos grupos experimentais na sessão teste, podemos observar que o grupo CLP apresentou um tempo de imobilidade significativamente menor em relação ao grupo SHAM, demonstrando que a doença acarreta em uma disfunção cognitiva. Em contrapartida, o grupo CLP + Vit E apresentou um tempo de imobilidade significativamente maior em relação ao grupo CLP não tratado, o que demonstra que o tratamento com Vitamina E é capaz de prevenir e/ou reverter a sequela cognitiva em modelo de memória aversiva *Freezing*. Não houve diferença significativa entre os grupos SHAM e CLP + Vit E.

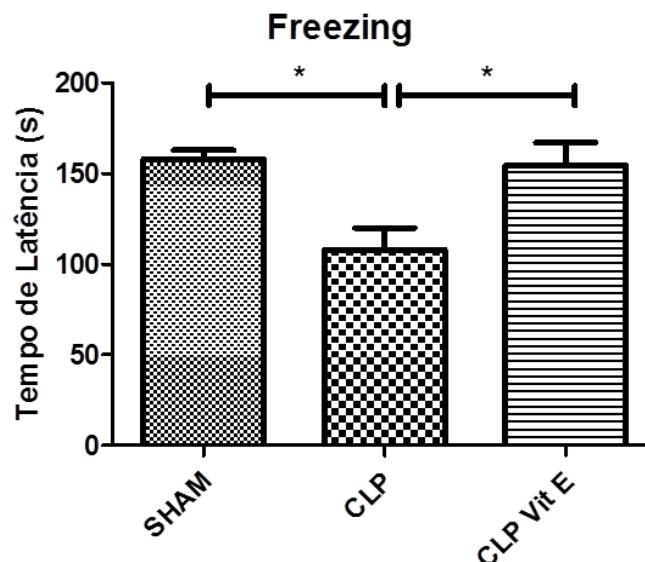


Figura 15. Avaliação da memória aversiva de camundongos em camundongos Swiss Webster não submetidos a indução de sepse (SHAM) e submetidos a indução de sepse experimental via CLP tratados ou não com vitamina E (CLP + Vit E 100 mg/kg). Camundongos machos Swiss Webster foram submetidos a indução de sepse experimental via CLP e foram tratados com veículo (CLP) ou tratados com vitamina E a 100 mg/kg v.o. (CLP + Vit E), em conjunto com o antibiótico Meropenem (10mg/kg v.s.). O tratamento foi feito 1 hora antes da indução de sepse via CLP e perdurou até 48 horas pós-CLP. A memória aversiva foi avaliada através do teste comportamental de congelamento condicionado (*Freezing*) a partir do 15º dia pós-CLP, n=15/grupo. *p<0,001; One-Way ANOVA (Tukey Multiple Comparison test).

6. Discussão

A sepse é uma síndrome resultante de uma complexa interação entre hospedeiro e agentes infecciosos, caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica e por alterações hemodinâmicas, distúrbios microcirculatórios e metabólicos, que contribuem para o desenvolvimento de disfunções orgânicas, que são determinantes para a evolução do quadro, e muitas vezes resultam na morte destes pacientes (Bone *et al.*, 1992; Singer *et al.*, 2016). Dados epidemiológicos apontam para cerca de 30 milhões de pessoas acometidas com sepse anualmente e 6 milhões de óbitos por ano, demonstrando a gravidade da doença (Fleischmann *et al.*, 2015; Lobo, 2019).

As terapias disponíveis atualmente para o tratamento da sepse são limitadas ao controle da infecção com antibióticos e medidas de suporte de vida, como o uso de agentes vasopressores para a manutenção da pressão arterial e suporte ventilatório (Rhodes *et al.*, 2017). A mortalidade da doença excede 50% e frequentemente a sepse é responsável por resultar em sequelas em diversos sistemas do organismo, inclusive no SNC, e o impacto da inflamação sistêmica sobre o dano cerebral agudo e crônico tem sido motivo de crescente interesse pela comunidade científica (Papadopoulos *et al.*, 2000; Hopkins e Jackson, 2006; Sharshar *et al.*, 2014). Sendo assim, é fundamental a realização de estudos que visam o melhor entendimento desta doença, de modo a subsidiar o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e alvos terapêuticos mais eficazes para esta condição patológica frequente e de elevada morbimortalidade.

A vitamina E é uma substância que possui alta atividade antioxidante e que está relacionada com o SNC, pois sua deficiência pode causar déficits cognitivos (Helmer *et al.*, 2003; Zaidi e Banu, 2004). Devido a sua característica de ser uma molécula lipossolúvel e antioxidante, a vitamina E vem sendo utilizada como tratamento para diversas doenças neurodegenerativas, como a DP, uma vez que possui afinidade com tecidos que tem alta concentração de lipídeos, como as células do SNC, e ainda consegue proteger o organismo dos efeitos prejudiciais dos eventos de estresse oxidativo, que são frequentes em doenças neurológicas (Fariss e Zhang, 2003; Pahrudin Arrozi *et al.*, 2020). Sendo assim, o presente trabalho avaliou o efeito do tratamento com vitamina E na EAS experimental e sua sequela cognitiva.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar que o tratamento adjuvante com vitamina E, associado a uma antibioticoterapia, foi capaz de reduzir a mortalidade dos animais tratados, e ainda atenuou os sinais clínicos característicos da sepse

observados através do escore clínico. Assim, podemos concluir que o tratamento com a vitamina E impactou na mortalidade dos animais e na redução do escore clínico, sugerindo que a introdução da antibioticoterapia adjuvante a antioxidantes confere uma proteção sistêmica, diminuindo a disfunção orgânica característica da sepse. Esses resultados corroboram com dados da literatura, uma vez que estudos utilizando derivados da vitamina E como tratamento para camundongos com sepse induzida por meio do modelo CLP, demonstraram uma redução da inflamação sistêmica e consequente proteção tecidual (Koga *et al.*, 2012; Kono *et al.*, 2012).

Diversas citocinas estão envolvidas no processo inflamatório que ocorre durante a sepse, como IL-1 β , IL-6, TNF- α , entre outras. O TNF- α é considerado uma das principais citocinas relacionadas a quadros inflamatórios e pode desempenhar variadas funções no organismo. Ele é produzido e secretado por células do sistema imune ativadas, como os macrófagos, monócitos e linfócitos, sendo o principal responsável por sua produção, os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos. A principal consequência da produção de TNF- α é estimular a resposta imunológica, através do recrutamento e ativação de células imunes para o local da infecção no organismo. Para que isto aconteça, o TNF- α promove a vasodilatação, induzida por meio de cascatas de sinalização intracelulares, como a cascata de ativação desencadeada pelo Fator Nuclear kappa B (NF- κ B), e além disso, promove a liberação de quimiocinas através das células endoteliais, que possuem atividade quimiotática, atraindo macrófagos, leucócitos e outras células, para o local do quadro infeccioso, desenvolvendo uma resposta inflamatória localizada, capaz de combater a infecção (Filippin *et al.*, 2008; P. Xu *et al.*, 2018). Assim, o TNF- α desempenha um papel crucial no desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica característica da sepse (Chen *et al.*, 2011).

Como esperado, foi observado que os níveis de TNF- α estavam significativamente aumentados no tecido cerebral de animais que sofreram indução de sepse e não foram tratados. Contudo, o tratamento com vitamina E foi capaz de reduzir os níveis teciduais de TNF- α , tendo um efeito anti-inflamatório.

Dessa forma, podemos afirmar que o aumento dos níveis de TNF- α no tecido cerebral do grupo CLP sem tratamento, foi ocasionado pelos diversos eventos que culminam no desenvolvimento do processo inflamatório e resposta imune exacerbada instalados 6 horas após a indução de sepse experimental (Poll *et al.*, 2017; F. Xu *et al.*, 2018). Como houve redução significativa da concentração de TNF- α no grupo CLP + Vit E, podemos concluir que o tratamento com vitamina E foi capaz de restringir a inflamação sistêmica proveniente do quadro de sepse, contribuindo para a diminuição dos níveis de TNF- α , da mesma forma como visto por Zang e colaboradores (2012), em que os tratamentos com vitamina E e vitamina E direcionada

à mitocôndria (Mito-Vit-E) levaram a uma diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6. Outros estudos sugerem o mesmo efeito utilizando o tratamento com outras vitaminas (Watkins *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2017).

Assim como as citocinas pró-inflamatórias, as citocinas anti-inflamatórias também possuem um papel importante na fisiopatologia da sepse. Elas são produzidas principalmente na fase conhecida como fase hipo-inflamatória, que ocorre logo após a fase aguda da doença. Essa fase hipo-inflamatória tem a função de minimizar os danos causados pela resposta inflamatória exacerbada que acontece no período inicial do quadro séptico (Hotchkiss *et al.*, 2013; Venet e Monneret, 2017). A citocina regulatória IL-10 representa uma das mais importantes citocinas anti-inflamatórias e tem como função produzir efeitos inibidores em diferentes células do sistema imune, tais como macrófagos, linfócitos T, e células natural killer (NK). A IL-10 também pode atuar regulando a diferenciação e maturação de linfócitos B, neutrófilos e células dendríticas, e por isso, funciona como uma molécula que induz a imunossupressão (Ouyang *et al.*, 2011).

Nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar que os níveis séricos e teciduais de IL-10 estavam significativamente maiores no grupo CLP não tratado, e que os níveis de IL-10 no grupo tratado com vitamina E estavam muito próximos aos valores encontrados no grupo controle. Esse resultado está de acordo com a literatura, já que estudos mostram que durante a fase aguda de um quadro inflamatório, o organismo produz uma elevada quantidade de citocinas anti-inflamatórias e regulatórias, como a IL-10, com o objetivo de amenizar os danos provenientes da resposta imune exacerbada que é disparada pelo processo de inflamação (Hotchkiss *et al.*, 2013, 2016; Reis *et al.*, 2017).

Um evento muito importante para o desenvolvimento da EAS e possíveis sequelas cognitivas é a neuroinflamação. Sabe-se que o SNC é um dos primeiros sistemas a serem atingidos pela resposta inflamatória sistêmica, causando disfunção da BHE e morte neuronal, caracterizando assim o processo de neuroinflamação. Analisar alterações no perfil de secreção de proteínas relacionadas à fisiologia do SNC é um bom mecanismo para determinar se há ou não neurodegeneração (Glass *et al.*, 2010; Sharshar *et al.*, 2014). Por isso, neste trabalho resolvemos avaliar os níveis S100 β , uma proteína de ligação ao cálcio que é expressa principalmente por astrócitos e células do tecido nervoso, tendo papel fundamental durante o desenvolvimento do SNC, pois pode atuar como fator neurotrófico e como proteína de sobrevivência neuronal. Seus níveis no meio extracelular e na corrente sanguínea são baixos, e caso ocorra uma elevação no mesmo, isso significa que existe algum processo

neurodegenerativo, levando a lesão neuronal, o que culmina no aumento da secreção de S100 β (Hu *et al.*, 1997; Thelin *et al.*, 2017).

Não conseguimos obter uma diferença estatística nos níveis de S100 β entre os grupos experimentais, porém há uma tendência que seus níveis estejam aumentados no grupo CLP não tratado, o que estaria relacionado com uma lesão neuronal proveniente da EAS e corrobora com dados da literatura que demonstram um aumento na secreção de S100 β em outras doenças que acometem o SNC, como doença de Alzheimer e esclerose múltipla (Cirillo *et al.*, 2015; Di Sante *et al.*, 2020), e em doenças infecciosas neurodegenerativas, como a malária cerebral (Medana *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo é um evento recorrente em doenças neurológicas, como a EAS e DP, e a produção em excesso de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio fazem parte da patogênese da sepse (Hanafy *et al.*, 2001; Miller e Sadeh, 2014; Salim, 2017). No presente estudo, o estresse oxidativo foi avaliado através da análise dos subprodutos da nitrosilação de proteínas, 3-Nitro, e da peroxidação lipídica, 4-HNE.

O óxido nítrico (NO) é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), e quando liberado em altas concentrações, pode se combinar com radicais livres, formando o peroxinitrito (ONOO⁻). O peroxinitrito por sua vez, através da reação de nitração, modifica porções da proteína tirosina, resultando na molécula de nitrotirosina (3-Nitro). Estudos demonstram que, a nitração dos resíduos de tirosina, alteram a estrutura e função da proteína, e que em condições patológicas, a nitrotirosina tem papel prejudicial nos processos de tradução e pós-tradução, modificando a morfologia de outras proteínas (Hanafy *et al.*, 2001).

Além disso, dados da literatura apontam que, citocinas pró-inflamatórias que estão envolvidas na fisiopatologia da sepse e outras doenças sistêmicas, podem ativar a enzima óxido nítrico sintase, principalmente NOS II, que quando ativada, produz altas concentrações de NO, priorizando a formação de peroxinitrito, que levará a produção de nitrotirosina por meio do processo de nitração da tirosina, desbalanceando assim a homeostase entre radicais livres e antioxidantes. A nitrotirosina, portanto, é uma molécula antigênica, que proporciona o recrutamento de células imunes e ativação adicional das enzimas produtoras de NO, contribuindo para a perpetuação do estresse oxidativo, sendo considerada uma molécula importante, que funciona como marcador do processo de dano oxidativo em inúmeras doenças sistêmicas, incluindo a sepse (Brealey *et al.*, 2002; Ahsan, 2013).

Observamos que a concentração de 3-Nitro no tecido cerebral do grupo CLP não tratado estava significativamente mais elevada, e que os níveis de 3-Nitro no grupo tratado com vitamina E foram significativamente menores quando comparados ao grupo CLP. Esse

resultado coincide com os dados presentes na literatura, pois, existe uma elevação significativa da produção de 3-Nitro nas condições que envolvem o estresse oxidativo ocasionado por um dano, nesse caso o processo inflamatório sistêmico, que tem sua fase aguda 6 horas após a indução de sepse experimental, onde há expressa liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação de células imunológicas, que secretam mediadores inflamatórios, os quais são responsáveis por definir o cenário do estresse oxidativo (Hanafy *et al.*, 2001; Kanthasamy *et al.*, 2012). O tratamento com vitamina E reduziu significativamente a concentração de 3-Nitro no tecido cerebral, comprovando a atividade antioxidante dessa substância, demonstrando que houve uma diminuição do quadro do estresse oxidativo, com redução na produção de NO e radicais livres, impedindo assim a formação de peroxinitrito, e consequentemente impossibilitando a nitração da tirosina, que por sua vez limita a produção de 3-Nitro (Mantzaris *et al.*, 2017; Prauchner, 2017).

Outra molécula que está incluída entre os principais marcadores de estresse oxidativo é a 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), que é produzida nas células a partir da oxidação de lipídeos. Ou seja, a 4-HNE é um importante produto oxidativo da decomposição de ácidos graxos insaturados, como ácido linoleico e ácido araquidônico. A produção de 4-HNE intracelular é considerada o índice mais confiável de que houve peroxidação lipídica induzida por radicais livres (Toyokuni *et al.*, 1994).

Estudos demonstram que, dependendo das concentrações intracelulares de 4-HNE, os impactos gerados por essa molécula podem ser diversos. Quando há concentração intracelular baixa, os efeitos causados por 4-HNE são benéficos, auxiliando em papéis fisiológicos como a proliferação e diferenciação celular, além de contribuir nos mecanismos de defesa antioxidantes. Entretanto, quando encontrada em níveis intracelulares altos, a 4-HNE desencadeia muitas reações prejudiciais, que incluem a ativação de vias de morte celular, através da indução de enzimas Caspase, inibição da síntese de moléculas de DNA e RNA, redução na síntese de proteínas e modificação seguida de inativação de proteínas e enzimas celulares, tendo como resultado final a morte celular (Comporti, 1998; Sayre *et al.*, 2006).

Portanto, os níveis de 4-HNE são elevados quando há um processo de estresse oxidativo no organismo, pois durante esse evento, existe um aumento na peroxidação dos lipídeos e consequentemente um acréscimo no produto dessa reação, gerando um acúmulo de 4-HNE no meio intracelular, causando assim efeitos deletérios na célula. Os altos níveis dessa molécula têm sido associados a patologia de doenças como aterosclerose, diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas como Alzheimer (Blesa *et al.*, 2015; Sousa *et al.*, 2017; Tönnies e Trushina, 2017).

Como resultado, foi possível observar que os níveis de 4-HNE no tecido cerebral do grupo CLP estavam significativamente maiores, e o que o tratamento com vitamina E foi capaz de reduzir os níveis dessa molécula. Esse resultado está de acordo com outros estudos, uma vez que existe um aumento significativo das concentrações de 4-HNE em situações que envolvem o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica ocasionada por um dano, nesse caso, o estabelecimento da fase aguda de um quadro inflamatório com liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias e ativação de células do sistema imune, que culminam no estresse oxidativo (Hernandes *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2016). A administração de vitamina E reduziu significativamente a concentração de 4-HNE no tecido cerebral, devido ao seu potencial antioxidante, evidenciando que houve uma diminuição do quadro do estresse oxidativo, com redução na produção de radicais livres, diminuindo assim a oxidação de lipídeos e limitando a produção de 4-HNE, da mesma forma como foi visto por Fariss e colaboradores (2003), em que o tratamento com diferentes derivados da vitamina E foi capaz de prevenir os tecidos da peroxidação lipídica.

A disfunção cognitiva em doenças sistêmicas é muito frequente e é relatada em diversas patologias que resultam no processo de neurodegeneração, que incluem a EAS (Iwashyna *et al.*, 2010; Schwalm *et al.*, 2014). Logo, neste trabalho, foram avaliadas as funções cognitivas dos diferentes grupos experimentais, através do modelo de memória aversiva e contextual, *Freezing*. Foi possível observar que o grupo CLP apresentou um tempo de latência inferior quando comparado aos demais grupos, isso significa que os animais desse grupo desenvolveram déficits cognitivos. A quebra da homeostase do organismo, representando pelo desbalanço de citocinas como TNF- α , IL-10 e em proteínas associadas ao SNC, como a S100 β , além da presença de marcadores de estresse oxidativo no grupo CLP não tratado, explicam o comprometimento cognitivo no modelo observado. Diferentemente, o grupo tratado com vitamina E em conjunto com o antibiótico Meropenem, apresentou um tempo de latência maior, semelhante ao encontrado no grupo controle, evidenciando que o tratamento com vitamina E foi capaz de prevenir a seqüela cognitiva após o desenvolvimento da sepse.

7. Conclusão

No presente estudo, utilizando o modelo CLP para indução de sepse experimental, em camundongos machos Swiss Webster, avaliamos o efeito do tratamento adjuvante com vitamina E no desenvolvimento da EAS, assim como nas sequelas cognitivas decorrentes da doença. Em conclusão, foi demonstrado que:

- O tratamento com 100 mg/kg de vitamina E associado ao tratamento com 10 mg/kg de Meropenem interferiu no desenvolvimento da doença, sendo observado através da análise do escore clínico, e aumentou a taxa de sobrevivência dos animais tratados;
- Vitamina E a 100 mg/kg foi capaz de reduzir a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, TNF- α e IL-10 respectivamente;
- O tratamento com 100 mg/kg de vitamina E diminuiu a expressão de marcadores de estresse oxidativo, 3-Nitro e 4-HNE;
- Seus efeitos ainda incluem a prevenção do comprometimento cognitivo, sugerindo uma função neuroprotetora em animais que sobreviveram a sepse experimental após o tratamento com antibiótico.

Assim, a vitamina E apresenta um papel promissor na prevenção dos danos provenientes da indução de sepse experimental e pode ser considerada como uma estratégia terapêutica para a EAS e disfunção neurocognitiva.

8. Referências Bibliográficas

- Ahsan, H. (2013). 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Human Immunology*, *74*(10), 1392–1399. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2013.06.009>
- Amaral, A., Opal, S. M., & Vincent, J.-L. (2004). Coagulation in sepsis. *Intensive Care Medicine*, *30*(6), 1032–1040. <https://doi.org/10.1007/s00134-004-2291-8>
- Andersen, S. K., Gjedsted, J., Christiansen, C., & Tønnesen, E. (2004). *The roles of insulin and hyperglycemia in sepsis pathogenesis Abstract : Hyperglycemia is a risk marker of*. <https://doi.org/10.1189/jlb.0503195.1>
- Angus, D. C., Linde-zwirble, W. T., Clermont, G., Griffin, M. F., & Clark, R. H. (2001). *United States Projections from California and New York*. *164*, 1154–1160.
- Araújo, C. V., Estado, V., Tibiriçá, E., Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H. C., & Silva, A. R. (2012). PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. *Microvascular Research*, *84*(2), 218–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mvr.2012.05.006>
- Arefian, H., Heublein, S., Scherag, A., Brunkhorst, F. M., Younis, M. Z., Moerer, O., Fischer, D., & Hartmann, M. (2017). Hospital-related cost of sepsis: A systematic review. *Journal of Infection*, *74*(2), 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.11.006>
- Asadi-Pooya, A. A., & Simani, L. (2020). Central nervous system manifestations of COVID-19: A systematic review. *Journal of the Neurological Sciences*, *413*, 116832. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116832>
- Baierle, M., Nascimento, S. N., Moro, A. M., Brucker, N., Freitas, F., Gauer, B., Durgante, J., Bordignon, S., Zibetti, M., Trentini, C. M., Duarte, M. M. F., Grune, T., Breusing, N., & Garcia, S. C. (2015). Relationship between inflammation and oxidative stress and cognitive decline in the institutionalized elderly. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2015*, 804198. <https://doi.org/10.1155/2015/804198>
- Banjara, M., & Ghosh, C. (2017). Sterile Neuroinflammation and Strategies for Therapeutic Intervention. *International Journal of Inflammation*, *2017*, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2017/8385961>
- Barichello, T., Martins, M. R., Reinke, A., Feier, G., Ritter, C., Quevedo, J., & Dal-Pizzol, F. (2005). Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation*. *Critical Care Medicine*, *33*(1). https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2005/01000/Cognitive_impairment_in_sepsis_survivors_from.33.aspx
- Basir, R., Rahiman, S. S. F., Hasballah, K., Chong, W. C., Talib, H., Yam, M. F., Jabbarzare, M., Tie, T. H., Othman, F., Moklas, M. A. M., Abdullah, W. O., & Ahmad, Z. (2012). Plasmodium berghei ANKA infection in ICR mice as a model of cerebral malaria. *Iranian Journal of Parasitology*, *7*(4), 62–74.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilacqua, L. R. M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron*, *53*(2), 261–277. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.025>
- Bianchi, M. E. (2007). *DAMPs , PAMPs and alarmins : all we need to know about danger Abstract : Multicellular animals detect pathogens*. *81*(January). <https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant

- defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.
<https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bitu-Moreno, J., Gregório, E. A., & Maffei, F. H. A. (2001). Efeitos do alfa-tocoferol nas lesões de isquemia-reperusão induzidas em pata direita de ratos. *Acta Cirurgica Brasileira*, 16(2), 68–74.
<https://doi.org/10.1590/S0102-86502001000200002>
- Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., & Jackson-Lewis, V. R. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00091>
- Bondi, F. S. (1992). *The incidence and outcome of neurological abnormalities malaria : a long-term follow-up of 62 survivors in childhood cerebral*. 17–19.
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M. H., & Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, 101(6), 1644–1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>
- Brealey, D., Brand, M., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., Smolenski, R., Davies, N. A., Cooper, C. E., & Singer, M. (2002). Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet (London, England)*, 360(9328), 219–223. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09459-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09459-X)
- Brealey, D., Karyampudi, S., Jacques, T. S., Novelli, M., Stidwill, R., Taylor, V., Smolenski, R. T., & Singer, M. (2004). Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(3), R491-7.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00432.2003>
- Brunkhorst, F. M., Oppert, M., Marx, G., Bloos, F., Ludwig, K., Putensen, C., Nierhaus, A., Jaschinski, U., Meier-Hellmann, A., Weyland, A., Gründling, M., Moerer, O., Riessen, R., Seibel, A., Ragaller, M., Büchler, M. W., John, S., Bach, F., Spies, C., ... German Study Group Competence Network Sepsis (SepNet), for the. (2012). Effect of Empirical Treatment With Moxifloxacin and Meropenem vs Meropenem on Sepsis-Related Organ Dysfunction in Patients With Severe Sepsis: A Randomized Trial. *JAMA*, 307(22), 2390–2399. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.5833>
- Cao, C., Yu, M., & Chai, Y. (2019). Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis. *Cell Death and Disease*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2015-1>
- Carlson, B. A., Tobe, R., Yefremova, E., Tsuji, P. A., Hoffmann, V. J., Schweizer, U., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L., & Conrad, M. (2016). Glutathione peroxidase 4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration. *Redox Biology*, 9, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.05.003>
- Carter, J. A., Neville, B. G. R., White, S., Ross, A. J., Otieno, G., Mturi, N., Musumba, C., & Newton, C. R. J. C. (2004). *Increased Prevalence of Epilepsy Associated with Severe Falciparum Malaria in Children*. 45(8), 978–981.
- Cavalcanti, J. C. de H. (2011). As mãos e as luvas na prática obstétricas. *Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul*, 54. <https://doi.org/10.1590/s0102-33061996000200017>
- Cederberg, J., Simán, C. M., & Eriksson, U. J. (2001). Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatric Research*, 49(6), 755–762. <https://doi.org/10.1203/00006450-200106000-00007>
- Chavan, S. S., Huerta, P. T., Robbiati, S., Valdes-Ferrer, S. I., Ochani, M., Dancho, M., Frankfurt, M., Volpe, B. T., Tracey, K. J., & Diamond, B. (2012). HMGB1 Mediates Cognitive Impairment in Sepsis Survivors. *Molecular Medicine*, 18(6), 930–937. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00195>

- Chen, D., Pan, H., Li, C., Lan, X., Liu, B., & Yang, G. (2011). Effects of hydrogen sulfide on a rat model of sepsis-associated encephalopathy. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 31(5), 632. <https://doi.org/10.1007/s11596-011-0573-2>
- Cho, S. Y., & Choi, J. H. (2014). Biomarkers of Sepsis. *Infection and Chemotherapy*, 46(1), 1–12. <https://doi.org/10.3947/ic.2014.46.1.1>
- Cirillo, C., Capoccia, E., Iuvone, T., Cuomo, R., Sarnelli, G., Steardo, L., & Esposito, G. (2015). S100B Inhibitor Pentamidine Attenuates Reactive Gliosis and Reduces Neuronal Loss in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2015, 508342. <https://doi.org/10.1155/2015/508342>
- Clark, I. A., Budd, A. C., Alleva, L. M., & Cowden, W. B. (2006). *Human malarial disease : a consequence of inflammatory cytokine release*. 32, 1–32. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-5-85>
- Cohen, J. (2002). *The immunopathogenesis of sepsis*. 420(December), 885–891.
- Cohen, J., Vincent, J., Adhikari, N. K. J., Machado, F. R., Angus, D. C., Calandra, T., Jaton, K., Giulieri, S., Delaloye, J., Opal, S., Tracey, K., Poll, T. Van Der, Pelfrene, E., & Paulo, S. (2015). Sepsis : a roadmap for future research. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(5), 581–614. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70112-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70112-X)
- Comporti, M. (1998). Lipid peroxidation and biogenic aldehydes: from the identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology. *Free Radical Research*, 28(6), 623–635. <https://doi.org/10.3109/10715769809065818>
- Craig, A. G., Grau, G. E., Janse, C., Kazura, J. W., Milner, D., & Barnwell, J. W. (2012). *The Role of Animal Models for Research on Severe Malaria*. 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002401>
- Crouser, E. D. (2004). Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion*, 4(5–6), 729–741. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.023>
- Csábi, E., Benedek, P., Janacsek, K., Zavecz, Z., Katona, G., & Nemeth, D. (2016). Declarative and Non-declarative Memory Consolidation in Children with Sleep Disorder . In *Frontiers in Human Neuroscience* (Vol. 9, p. 709). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnhum.2015.00709>
- De la Fuente, M., & Miquel, J. (2009). An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Current Pharmaceutical Design*, 15(26), 3003–3026. <https://doi.org/10.2174/138161209789058110>
- Dejager, L., Pinheiro, I., Dejonckheere, E., & Libert, C. (2011). Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends in Microbiology*, 19(4), 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.01.001>
- Di Sante, G., Amadio, S., Sampaiolese, B., Clementi, M. E., Valentini, M., Volonté, C., Casalbore, P., Ria, F., & Michetti, F. (2020). The S100B Inhibitor Pentamidine Ameliorates Clinical Score and Neuropathology of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Mouse Model. *Cells*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/cells9030748>
- Druilhe, P., Hagan, P., & Rook, G. A. W. (2002). The importance of models of infection in the study of disease resistance. *Trends in Microbiology*, 10(10), 38–46. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02437-X](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02437-X)
- Fariss, M. W., & Zhang, J. G. (2003). Vitamin E therapy in Parkinson's disease. *Toxicology*, 189(1–2), 129–146. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00158-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00158-6)

- Ferrando, S. J., Klepacz, L., Lynch, S., Tavakkoli, M., Dornbush, R., Baharani, R., Smolin, Y., & Bartell, A. (2020). COVID-19 Psychosis: A Potential New Neuropsychiatric Condition Triggered by Novel Coronavirus Infection and the Inflammatory Response? *Psychosomatics*, *61*(5), 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.psym.2020.05.012>
- Filippin, L. I., Vercelino, R., Marroni, N. P., & Xavier, R. M. (2008). Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*, *152*(3), 415–422. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03634.x>
- Fink, M P. (2000). Cytopathic hypoxia. A concept to explain organ dysfunction in sepsis. *Minerva Anestesiologica*, *66*(5), 337–342. <http://europepmc.org/abstract/MED/10965712>
- Fink, Mitchell P., & Heard, S. O. (1990). Laboratory models of sepsis and septic shock. *Journal of Surgical Research*, *49*(2), 186–196. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(90\)90260-9](https://doi.org/10.1016/0022-4804(90)90260-9)
- Fink, Mitchell P. (2002). Cytopathic hypoxia: Is oxygen use impaired in sepsis as a result of an acquired intrinsic derangement in cellular respiration? *Critical Care Clinics*, *18*(1), 165–175. [https://doi.org/10.1016/S0749-0704\(03\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0749-0704(03)00071-X)
- Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N. K. J., Hartog, C. S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D. C., & Reinhart, K. (2015). *Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis – Current estimates and limitations*.
- Galley, H. F. (2011). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, *107*(1), 57–64. <https://doi.org/10.1093/bja/aer093>
- Gao, Y.-L., Lu, B., Zhai, J.-H., Liu, Y.-C., Qi, H.-X., Yao, Y., Chai, Y.-F., & Shou, S.-T. (2017). The Parenteral Vitamin C Improves Sepsis and Sepsis-Induced Multiple Organ Dysfunction Syndrome via Preventing Cellular Immunosuppression. *Mediators of Inflammation*, *2017*, 4024672. <https://doi.org/10.1155/2017/4024672>
- Garrido, A. G., Figueiredo, L. F. P. de, & Silva, M. R. e. (2004). Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. *Acta Cirurgica Brasileira*, *19*(2), 82–88. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502004000200001>
- Gazzinelli, R. T., Kalantari, P., Fitzgerald, K. A., & Golenbock, D. T. (2014). Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology*, *14*(11), 744–757. <https://doi.org/10.1038/nri3742>
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, *140*(6), 918–934. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>
- Goldim, M. P. D. S. (2018). *Estudo Do Comportamento Doentio Na Sepse Experimental E O Envolvimento Da Disfunção Cerebral E Ativação Microglial*. [https://riuni.unisul.br/bitstream/handle/12345/6385/TESE Mariana Goldim FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riuni.unisul.br/bitstream/handle/12345/6385/TESE_Mariana_Goldim_FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Grelon, F., Megarbane, B., Ph, D., Anguel, N., Tulzo, Y. Le, Ph, D., Conrad, M., Robert, R., Ph, D., Gonzalez, F., Guittou, C., Ph, D., Tamion, F., Ph, D., Tonnelier, J., Guezennec, P., Ricard, J., Ph, D., Hervé, F., ... Ph, D. (2014). *High versus Low Blood-Pressure Target in Patients with Septic Shock*. 1–11. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312173>
- Gush, H. P., Halpern, M., & Wishnow, E. H. (1990). Rocket measurement of the cosmic-background-radiation mm-wave spectrum. *Physical Review Letters*, *65*(5), 537–540. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.65.537>

- Hanafy, K. A., Krumenacker, J. S., & Murad, F. (2001). NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 7(4), 801–819.
- Hansen, D. S. (2012). Inflammatory Responses Associated with the Induction of Cerebral Malaria: Lessons from Experimental Murine Models. *PLoS Pathogens*, 8(12), 8–10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003045>
- Helmer, C., Peuchant, E., Letenneur, L., Bourdel-Marchasson, I., Larrieu, S., Dartigues, J. F., Dubourg, L., Thomas, M. J., & Barberger-Gateau, P. (2003). Association between antioxidant nutritional indicators and the incidence of dementia: Results from the PAQUID prospective cohort study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(12), 1555–1561. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601724>
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 463–477. <https://doi.org/10.1038/nri3705>
- Hernandes, M. S., D'Avila, J. C., Trevelin, S. C., Reis, P. A., Kinjo, E. R., Lopes, L. R., Castro-Faria-Neto, H. C., Cunha, F. Q., Britto, L. R. G., & Bozza, F. A. (2014). The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 36. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-36>
- Hopkins, R. O., & Jackson, J. C. (2006). Long-term Neurocognitive Function After Critical Illness. *CHEST*, 130(3), 869–878. <https://doi.org/10.1378/chest.130.3.869>
- Hotchkiss, R. S., Moldawer, L. L., Opal, S. M., Reinhart, K., Turnbull, I. R., & Vincent, J. L. (2016). Sepsis and septic shock. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(June). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45>
- Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression : from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Publishing Group*, 13(DECEMBER). <https://doi.org/10.1038/nri3552>
- Howard, A. C., McNeil, A. K., & McNeil, P. L. (2011). Promotion of plasma membrane repair by vitamin e. *Nature Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1594>
- Hu, J., Ferreira, A., & Van Eldik, L. J. (1997). S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 69(6), 2294–2301. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69062294.x>
- Hunt, N. H., Ball, H. J., Hansen, A. M., Khaw, L. T., Guo, J., Bakmiwewa, S., Mitchell, A. J., Combes, V., & Grau, G. E. R. (2014). Cerebral malaria: gamma-interferon redux. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00113>
- Instituto Latino Americano para Estudos da Sepse (ILAS) (2015). Sepse: um problema de saúde pública. 90 p.
- Izquierdo I., Cammarota M., Silva W. C., Bevilacqua L. R. M., Rossato J. I., Bonini J. S., Mello P., Benetti F., J. C. C. & J. H. M. (2008). The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 80, 115–127.
- Iwashyna, T. J., Ely, E. W., Smith, D. M., & Langa, K. M. (2010). Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 304(16), 1787–1794. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1553>
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). Memory formation: The sequence of biochemical events in the

- hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68(3), 285–316. <https://doi.org/10.1006/nlme.1997.3799>
- Jundi, B., Ryu, H., Lee, D., Abdunour, R. E., Engstrom, B. D., Duvall, M. G., Higuera, A., Pinilla-vera, M., Benson, M. E., Lee, J., Krishnamoorthy, N., Baron, R. M., Han, J., Voldman, J., & Levy, B. D. (2019). Sampling of peripheral blood from sepsis patients correlates with disease severity. *Nature Biomedical Engineering*, 3(December). <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0473-5>
- Kanthasamy, A., Chandramani Shivalingappa, P., Jin, H., Anantharam, V., & Kanthasamy, A. (2012). N-acetyl cysteine protects against methamphetamine-induced dopaminergic neurodegeneration via modulation of redox status and autophagy in dopaminergic cells. *Parkinson's Disease*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/424285>
- Kodentsova, V. M., Vrzhesinskaia, O. A., & Mazo, V. K. (2013). [Vitamins and oxidative stress]. *Voprosy pitaniia*, 82(3), 11–18.
- Koga, H., Hagiwara, S., Inomata, M., Kono, Y., Oyama, Y., Kai, S., Nishida, T., & Noguchi, T. (2012). The new vitamin E derivative, ETS-GS, protects against cecal ligation and puncture-induced systemic inflammation in rats. *Inflammation*, 35(2), 545–553. <https://doi.org/10.1007/s10753-011-9344-2>
- Kollef, M. H., Micek, S. T., & Pharm, D. (2010). *Using Protocols to Improve Patient Outcomes in the Intensive Care Unit : Focus on Mechanical Ventilation and Sepsis*. 1(212), 19–30.
- Kono, Y., Inomata, M., Hagiwara, S., Shiraishi, N., Noguchi, T., & Kitano, S. (2012). A newly synthetic vitamin E derivative, E-Ant-S-GS, attenuates lung injury caused by cecal ligation and puncture-induced sepsis in rats. *Surgery*, 151(3), 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2011.08.003>
- Lepak, A., & Andes, D. (2011). Fungal Sepsis: Optimizing Antifungal Therapy in the Critical Care Setting. *Critical Care Clinics*, 27(1), 123–147. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2010.11.001>
- Lever, A., & Mackenzie, I. (2007). Sepsis: Definition, epidemiology, and diagnosis. *British Medical Journal*, 335(7625), 879–883. <https://doi.org/10.1136/bmj.39346.495880.AE>
- Levi, M., & Poll, T. Van Der. (2017). Coagulation and sepsis. *Thrombosis Research*, 149, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.11.007>
- Levy, M. M., Evans, L. E., & Rhodes, A. (2018). *The Surviving Sepsis Campaign Bundle : 2018 Update*. 997–1000. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003119>
- Levy, M. M., Fink, M. P., Marshall, J. C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S. M., Vincent, J. L., & Ramsay, G. (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Medicine*, 29(4), 530–538. <https://doi.org/10.1007/s00134-003-1662-x>
- Li, H., Liu, L., Zhang, D., Xu, J., Dai, H., Tang, N., Su, X., & Cao, B. (2020). SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *The Lancet*, 395(10235), 1517–1520. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30920-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30920-X)
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Lin, G.-L., McGinley, J. P., Drysdale, S. B., & Pollard, A. J. (2018). Epidemiology and Immune Pathogenesis of Viral Sepsis . In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, p. 2147).

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02147>

- Liu, M., Zhang, H., Song, X., Wei, C., Xiong, Z., Yu, F., Li, C., Ai, F., Guo, G., & Wang, X. (2018). NaCl: for the safer in vivo use of antibacterial silver based nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, *13*, 1737–1748. <https://doi.org/10.2147/IJN.S153168>
- Lobo. (2019). *Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario : the Brazilian ICUs project Mortalidade por sepse no Brasil em um cenário real : projeto. 2016*(Figure 1), 1–4. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20190008>
- Lobo, S. M., Rezende, E., Mendes, C. L., & Oliveira, M. C. de. (2019). Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: the Brazilian ICUs project TT - Mortalidade por sepse no Brasil em um cenário real: projeto UTIs Brasileiras. *Revista Brasileira de terapia intensiva*, *31*(1), 1–4. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20190008>
- Mantzaris, K., Tsolaki, V., & Zakyntinos, E. (2017). Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 5985209. <https://doi.org/10.1155/2017/5985209>
- Marik, P. E., & Raghavan, M. (2004). Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive Care Medicine*, *30*(5), 748–756. <https://doi.org/10.1007/s00134-004-2167-y>
- Medana, I. M., Idro, R., & Newton, C. R. J. C. (2007). Axonal and astrocyte injury markers in the cerebrospinal fluid of Kenyan children with severe malaria. *Journal of the Neurological Sciences*, *258*(1–2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.03.005>
- Michels, M., Steckert, A. V., Quevedo, J., Barichello, T., & Dal-Pizzol, F. (2015). Mechanisms of long-term cognitive dysfunction of sepsis: from blood-borne leukocytes to glial cells. *Intensive Care Medicine Experimental*, *3*(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s40635-015-0066-x>
- Michels, M., Vieira, A. S., Vuolo, F., Zapelini, H. G., Mendonça, B., Mina, F., Dinguini, D., Steckert, A., Schuck, P. F., Quevedo, J., Petronilho, F., & Dal-Pizzol, F. (2015). The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain, Behavior, and Immunity*, *43*, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.07.002>
- Miller, M. W., & Sadeh, N. (2014). *Traumatic stress , oxidative stress and post-traumatic stress disorder : neurodegeneration and the accelerated-aging hypothesis. March*, 1156–1162. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.111>
- Minter, B. E., Lowes, D. A., Webster, N. R., & Galley, H. F. (2020). Reply to comment on “Differential effects of mitoVitE, α-tocopherol and trolox on oxidative stress, mitochondrial function and inflammatory signalling pathways in endothelial cells cultured under conditions mimicking sepsis. *Antioxidants* 2020, *9*(3), 195.” *Antioxidants*, *9*(6). <https://doi.org/10.3390/antiox9060464>
- Naschitz, J. E., & Paz, A. (2009). Management of sepsis. *Challenges in Acute Geriatric Care*, 83–105.
- Nguyen, H. B., Rivers, E. P., Abrahamian, F. M., Moran, G. J., Abraham, E., Trzeciak, S., Huang, D. T., Osborn, T., Stevens, D., & Talan, D. A. (2006). Severe Sepsis and Septic Shock: Review of the Literature and Emergency Department Management Guidelines. *Annals of Emergency Medicine*, *48*(1), 54.e1. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2006.02.015>
- Oliveira, C. A. de. (2017). *a Atuação Do Enfermeiro Frente Ao Diagnóstico De Sepse Na Unidade De Terapia Intensiva: Uma Revisão Bibliográfica*. <https://www.ccih.med.br/wp-content/uploads/2017/08/Claudinei.pdf>

- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A., & Hymowitz, S. G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual Review of Immunology*, 29, 71–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>
- Pahrudin Arrozi, A., Shukri, S. N. S., Wan Ngah, W. Z., Mohd Yusof, Y. A., Ahmad Damanhuri, M. H., Jaafar, F., & Makpol, S. (2020). Comparative Effects of Alpha- and Gamma-Tocopherol on Mitochondrial Functions in Alzheimer's Disease In Vitro Model. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65570-4>
- Papadopoulos, M. C., Davies, D. C., Moss, R. F., Tighe, D., & Bennett, E. D. (2000). Pathophysiology of septic encephalopathy: A review. *Critical Care Medicine*, 28(8). https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2000/08000/Pathophysiology_of_septic_encephalopathy__A_review.57.aspx
- Peninck, P. P., & Machado, R. C. (2012). *Implementation of sepsis algorithm by nurses in the intensive care unit* 13(1).
- Perry, V. H., Cunningham, C., & Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nature Reviews Immunology*, 7(2), 161–167. <https://doi.org/10.1038/nri2015>
- Petronilho, F., Périco, S. R., Vuolo, F., Mina, F., Constantino, L., Comim, C. M., Quevedo, J., Souza, D. O., & Dal-Pizzol, F. (2012). Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(6), 904–910. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.03.007>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Poll, T. Van Der, Veerdonk, F. L. Van De, Scicluna, B. P., & Netea, M. G. (2017). The immunopathology of sepsis. *Nature Publishing Group*, 17(7), 407–420. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.36>
- Prauchner, C. A. (2017). Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. *Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries*, 43(3), 471–485. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.09.023>
- R, K. Kb. Ms. Sp. Db. (2015). *Mortality Related to Severe Sepsis and Septic Shock Among Critically Ill Patients in Australia and New Zealand, 2000-2012*. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.2637>
- Reis, P. A., Alexandre, P. C. B., D'Avila, J. C., Siqueira, L. D., Antunes, B., Estado, V., Tibiriça, E. V., Verdonk, F., Sharshar, T., Chrétien, F., Castro-Faria-Neto, H. C., & Bozza, F. A. (2016). Statins prevent cognitive impairment after sepsis by reverting neuroinflammation, and microcirculatory/endothelial dysfunction. *Brain, Behavior, and Immunity*, 60, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.006>
- Reis, P. A., Estado, V., da Silva, T. I., d'Avila, J. C., Siqueira, L. D., Assis, E. F., Bozza, P. T., Bozza, F. A., Tibiriça, E. V., Zimmerman, G. A., & Castro-Faria-Neto, H. C. (2012). Statins Decrease Neuroinflammation and Prevent Cognitive Impairment after Cerebral Malaria. *PLoS Pathogens*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003099>
- Rhodes, A., Bs, M. B., Co-chair, R., Evans, L. E., Co-chair, F., Alhazzani, W., Levy, M. M., Antonelli, M., Ferrer, R., Kumar, A., Sevransky, J. E., Sprung, C. L., Nunnally, M. E., Rochweg, B., Rubinfeld, G. D., Angus, D. C., Annane, D., Beale, R. J., Bs, M. B., ... Zimmerman, J. L. (2017). *Surviving Sepsis Campaign : International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock : 2016*.

<https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002255>

- Richard M. Ransohoff. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, 353(6301), 772–777. <https://doi.org/10.1126/science.aag3194>
- Rogers, D. C., Fisher, E. M., Brown, S. D., Peters, J., Hunter, A. J., & Martin, J. E. (1997). Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 8(10), 711–713. <https://doi.org/10.1007/s003359900551>
- Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Network*, 18(4), e27. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>
- Romanova, M. (2019). Pathophysiology of sepsis. *Journal of Visual Communication in Medicine*, 42(4), 195–197. <https://doi.org/10.1080/17453054.2019.1666659>
- Rudd, K. E., Johnson, S. C., Agesa, K. M., Shackelford, K. A., Tsoi, D., Kievlan, D. R., Colombara, D. V., Ikuta, K. S., Kissoon, N., Finfer, S., Fleischmann-Struzek, C., Machado, F. R., Reinhart, K. K., Rowan, K., Seymour, C. W., Watson, R. S., West, T. E., Marinho, F., Hay, S. I., ... Naghavi, M. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet (London, England)*, 395(10219), 200–211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)
- Sahu, U., Sahoo, P. K., Kar, S. K., Mohapatra, B. N., & Ranjit, M. (2013). Association of TNF level with production of circulating cellular microparticles during clinical manifestation of human cerebral malaria. *Human Immunology*, 74(6), 713–721. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2013.02.006>
- Sales Júnior, J. A. L., David, C. M., Hatum, R., Souza, P. C. S. P., Japiassú, A., Pinheiro, C. T. S., Friedman, G., Silva, O. B. da, Dias, M. D., Koterba, E., Dias, F. S., Piras, C., & Luiz, R. R. (2006). Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. In *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* (Vol. 18, pp. 9–17). scielo .
- Salim, S. (2017). Oxidative Stress and the Central Nervous System. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 360(1), 201–205. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237503>
- Salim, S. (2020). *Estresse Oxidativo e Sistema Nervoso Central*. 1–16.
- Sayre, L. M., Lin, D., Yuan, Q., Zhu, X., & Tang, X. (2006). Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. *Drug Metabolism Reviews*, 38(4), 651–675. <https://doi.org/10.1080/03602530600959508>
- Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M., & Poll, T. Van Der. (2008). *Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis*. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607373>
- Schwalm, M. T., Pasquali, M., Miguel, S. P., dos Santos, J. P. A., Vuolo, F., Comim, C. M., Petronilho, F., Quevedo, J., Gelain, D. P., Moreira, J. C. F., Ritter, C., & Dal-Pizzol, F. (2014). Acute Brain Inflammation and Oxidative Damage Are Related to Long-Term Cognitive Deficits and Markers of Neurodegeneration in Sepsis-Survivor Rats. *Molecular Neurobiology*, 49(1), 380–385. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8526-3>
- Schwartz, D. R., Malhotra, A., & Fink, M. P. (1999). Cytopathic Hypoxia in Sepsis: An Overview. *Sepsis*, 2(4), 279–289. <https://doi.org/10.1023/A:1009830318674>

- Shane, A. L., & Stoll, B. J. (2013). Recent developments and current issues in the epidemiology, diagnosis, and management of bacterial and fungal neonatal sepsis. *American Journal of Perinatology*, *30*(2), 131–141. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1333413>
- Sharshar, T., Bozza, F., & Chrétien, F. (2014). Neuropathological processes in sepsis. *The Lancet Neurology*, *13*(6), 534–536. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70064-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70064-X)
- Shenoy, S. (2020). Coronavirus (Covid-19) sepsis: revisiting mitochondrial dysfunction in pathogenesis, aging, inflammation, and mortality. *Inflammation Research*, *69*(11), 1077–1085. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01389-z>
- Siddiqui, S. (2007). Not “surviving sepsis” in the developing countries. *Journal of the Indian Medical Association*, *105*(4), 221. <http://europepmc.org/abstract/MED/17822195>
- Silva, E., Pedro, M. D. A., Cristina, A., Sogayar, B., Mohovic, T., De, C. L., Silva, O., Janiszewski, M., Guilherme, R., Cal, R., Sousa, É. F. De, Abe, T. P., Andrade, J. De, Matos, J. D. De, Rezende, E., Assunção, M., Avezum, Á., Rocha, P. C. S., Faissol, G., ... Knobel, E. (2004). *Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study)*. *8*(4), 251–260. <https://doi.org/10.1186/cc2892>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., Poll, T. Der, Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *315*(8), 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Singh, P., Parajuli, N., Mayeux, P. R., & MacMillan-Crow, L. A. (2016). Renal Mitochondrial Lipid Peroxidation during Sepsis. *Journal of Kidney*, *2*(1). <https://doi.org/10.4172/jok.1000116>
- Sogayar, A. M. C., Machado, F. R., Rea-neto, A., Dornas, A., Grion, C. M. C., Lobo, S. M. A., Tura, B. R., Silva, C. L. O., Cal, R. G. R., Beer, I., Jr, V. M., Jr, J. S., & Kayath, M. (2008). *A Multicentre, Prospective Study to Evaluate Costs of Septic Patients in Brazilian Intensive Care Units*. *26*(5), 425–434.
- Sousa, B. C., Pitt, A. R., & Spickett, C. M. (2017). Chemistry and analysis of HNE and other prominent carbonyl-containing lipid oxidation compounds. *Free Radical Biology & Medicine*, *111*, 294–308. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.003>
- Souza, M. C., Padua, T. A., & Henriques, M. G. (2015). Endothelial-Leukocyte Interaction in Severe Malaria: Beyond the Brain. *Mediators of Inflammation*, *2015*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/168937>
- Sumadhya D Fernando, Chaturaka Rodrigo, and S. R. (2010). The “hidden” burden of malaria: Cognitive impairment following infection. *Malaria Journal*, *9*(1), 366. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-366>
- Theelin, E. P., Nelson, D. W., & Bellander, B.-M. (2017). A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury. *Acta Neurochirurgica*, *159*(2), 209–225. <https://doi.org/10.1007/s00701-016-3046-3>
- Tönnies, E., & Trushina, E. (2017). Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease : JAD*, *57*(4), 1105–1121. <https://doi.org/10.3233/JAD-161088>
- Toyokuni, S., Uchida, K., Okamoto, K., Hattori-Nakakuki, Y., Hiai, H., & Stadtman, E. R. (1994). Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(7), 2616–2620. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.7.2616>

- Trindade, L., Suchard, C., Martins, F., & Nunes, F. (2014). *Estratégia de detecção precoce e redução de mortalidade na sepse grave. May 2009.*
- Tronel, C., Rochefort, G. Y., Arlicot, N., Bodard, S., Chalon, S., & Antier, D. (2013). Oxidative Stress Is Related to the Deleterious Effects of Heme Oxygenase-1 in an In Vivo Neuroinflammatory Rat Model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/264935>
- Uchida, K. (2013). Redox-derived damage-associated molecular patterns: Ligand function of lipid peroxidation adducts. *Redox Biology*, 1(1), 94–96. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.005>
- Uhle, F., Lichtenstern, C., Brenner, T., & Weigand, M. A. (2015). Sepsis und Multiorganversagen - Pathophysiologie der Sepsis. *Anesthesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie*, 50(2), 114–122. <https://doi.org/10.1055/s-0041-100391>
- Van Gool, W. A., van de Beek, D., & Eikelenboom, P. (2010). Systemic infection and delirium: when cytokines and acetylcholine collide. *The Lancet*, 375(9716), 773–775. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61158-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61158-2)
- Venet, F., & Monneret, G. (2017). *Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression.* <https://doi.org/10.1038/nmeph.2017.165>
- Verma, S. (2016). Laboratory Animal Models to Mimic Human Sepsis: A Review. *Research & Reviews: Journal of Zoological Sciences*, 4(2), 1–6. <http://www.royj.com/open-access/laboratory-animal-models-to-mimic-human-sepsis-a-review-.php?aid=73496>
- Viana, R. A. P. P., Machado F. R., Souza J. L. A. (2017) Sepse, um problema de saúde pública: a atuação e colaboração da enfermagem na rápida identificação e tratamento da doença - Instituto Latino Americano para Estudos da Sepse (ILAS). 65 p.
- Vijayaraghavan, R., Suribabu, C. S., Sekar, B., Oommen, P. K., Kavithalakshmi, S. N., Madhusudhanan, N., & Panneerselvam, C. (2005). Protective role of vitamin E on the oxidative stress in Hansen's disease (Leprosy) patients. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59(10), 1121–1128. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602221>
- Vincent, J. L., Opal, S. M., Marshall, J. C., & Tracey, K. J. (2013). Sepsis definitions: Time for change. *The Lancet*, 381(9868), 774–775. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61815-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61815-7)
- Wang, H., & Peng, R. Y. (2016). Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity. *Military Medical Research*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40779-016-0095-0>
- Watkins, R. R., Yamshchikov, A. V, Lemonovich, T. L., & Salata, R. A. (2011). The role of vitamin D deficiency in sepsis and potential therapeutic implications. *The Journal of Infection*, 63(5), 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.07.002>
- Wenclewska, S., Szymczak-Pajor, I., Drzewoski, J., Bunk, M., & Śliwińska, A. (2019). Vitamin D Supplementation Reduces Both Oxidative DNA Damage and Insulin Resistance in the Elderly with Metabolic Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20122891>
- Wichterman, K. A., Baue, A. E., & Chaudry, I. H. (1980). Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research*, 29(2), 189–201. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(80\)90037-2](https://doi.org/10.1016/0022-4804(80)90037-2)

- Wu, Y., Xu, X., Chen, Z., Duan, J., Hashimoto, K., Yang, L., Liu, C., & Yang, C. (2020). Nervous system involvement after infection with COVID-19 and other coronaviruses. *Brain, Behavior, and Immunity*, 87, 18–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.03.031>
- Xu, F., Lin, S., Yan, X., Wang, C., Tu, H., Yin, Y., & Cao, J. (2018). Interleukin 38 Protects Against Lethal Sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*, 218(7), 1175–1184. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy289>
- Xu, P., Liu, X., Li, Y., Yin, X., & Liu, X. (2018). Gene Expression Levels of Peripheral Blood Mononuclear Cells IL-6 and TNF- α ; in Children with Bacterial and Viral Infectious Diarrhea. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*, 28(12), 934–936. <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2018.12.934>
- Yuan, H., Wan, J., Li, L., Ge, P., Li, H., & Zhang, L. (2012). Therapeutic benefits of the group B3 vitamin nicotinamide in mice with lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *Pharmacological Research*, 65(3), 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.11.014>
- Zaidi, S. M. K. R., & Banu, N. (2004). Antioxidant potential of vitamins A, e and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta*, 340(1–2), 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2003.11.003>
- Zang, Q. S., Sadek, H., Maass, D. L., Martinez, B., Ma, L., Kilgore, J. A., Williams, N. S., Frantz, D. E., Wigginton, J. G., Nwariaku, F. E., Wolf, S. E., & Minei, J. P. (2012). Specific inhibition of mitochondrial oxidative stress suppresses inflammation and improves cardiac function in a rat pneumonia-related sepsis model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 302(9), H1847–H1859. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00203.2011>
- Zanza, C., Thangathurai, J., Audo, A., Muir, H. A., Candelli, M., Pignataro, G., Thangathurai, D., Cicchinelli, S., Racca, F., Longhitano, Y., & Franceschi, F. (2019). Oxidative stress in critical care and vitamins supplement therapy: “a beneficial care enhancing”. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(17), 7703–7712. https://doi.org/10.26355/eurrev_201909_18894
- Zeerleder, S., & Hack, C. E. (2005). *Disseminated Intravascular Coagulation in Sepsis* *. <https://doi.org/10.1378/chest.128.4.2864>