

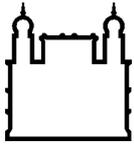
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

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

**AÇÃO DA ROSIGLITAZONA NA ENCEFALOPATIA SÉPTICA ORIUNDA DE
PNEUMONIA**

GABRIEL GUTFILEN SCHLESINGER

Rio de Janeiro
Julho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

GABRIEL GUTFILEN SCHLESINGER

Ação Da Rosiglitazona Na Encefalopatia Séptica Oriunda De Pneumonia

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

Orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Ribeiro Silva

RIO DE JANEIRO

Julho de 2016

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

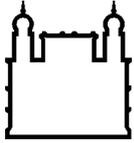
S342 Schlesinger, Gabriel Gutflen

Ação da Rosiglitazona na encefalopatia séptica oriunda de pneumonia
/ Gabriel Gutflen Schlesinger. – Rio de Janeiro, 2016.
xv, 71 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular, 2016.
Bibliografia: f. 65-71

1. Sepsis. 2. Rosiglitazona. 3. *Klebsiella pneumoniae*. 4. Dano
cognitivo. 5. Receptor ativado por proliferadores de peroxissomo gama
(PPAR gama). I. Título.

CDD 614.577



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

GABRIEL GUTFILEN SCHLESINGER

**AÇÃO DA ROSIGLITAZONA NA ENCEFALOPATIA SÉPTICA ORIUNDA DE
PNEUMONIA**

ORIENTADORES: Prof^a. Dr^a. Adriana Ribeiro Silva

Aprovada em: 05/ 07 / 2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Vanessa Estato de Freitas Almeida - **Presidente**

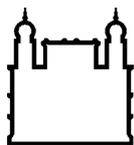
Prof. Dr. Frederico Rogerio Ferreira

Prof. Dr^a. Aline Araujo dos Santos Rabelo

Prof. Dr. Alexandre dos Santos Rodrigues

Prof. Dr. Vinicius de Frias Carvalho

Rio de Janeiro, 05 de julho de 2016.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho a família Weglowski, o efeito borboleta nem sempre tende ao caos.

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer às agências de fomento a pesquisa CNPq, CAPES e FAPERJ; sem elas seria impossível a realização deste trabalho. Assim como a FIOCRUZ que proporcionou meu crescimento pessoal e científico.

Aos pesquisadores, companheiros de bancada e outros integrantes da família Imunofarmacologia pela paciência e colaboração. Especialmente a Rose Branco pela amizade e pelos cafés, aos componentes do grupo Adriano, Any, Bia, Carol, Elba, Isabel, Jairo, Rebeca e aos demais que participaram desta obra em horários pouco convencionais.

A Dra. Patrícia A. Reis pela potenciação e transdução sináptica mesmo em momentos de excitotoxicidade.

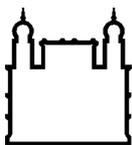
Aos meus pais científicos, Dr^a. Adriana Ribeiro Silva e Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque, que nossos laços transcenderam a orientação.

Agradeço a todos aqueles que me acompanharam e me incentivaram e possibilitaram a realização deste trabalho principalmente minhas avós Mary (I.M.) e Mira, meus pais, Vivete e Gilberto, à minha irmã Guile e ao resto da família pelas broncas, educação, suporte por me proporcionarem o lar. E por mais que falassem que o tijolo pesa mais que a caneta, tenho certeza que a caneta cansa mais.

“One of the difficulties in understanding the brain is that it is like nothing so much as a lump of porridge”

(Uma das dificuldades de se entender o cérebro é que não há nada similar quanto uma pelota de mingau).

-Richard L. Gregory



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

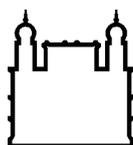
AÇÃO DA ROSIGLITAZONA NA ENCEFALOPATIA SÉPTICA ORIUNDA DE PNEUMONIA

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Gabriel Gutfilen Schlesinger

A sepse é um processo inflamatório sistêmico exacerbado associado a uma infecção que generalizada pode evoluir para o choque séptico e conseqüentemente a morte. Nos últimos 30 anos a mortalidade por essa patologia reduziu 30%. Com esse avanço na clínica foi possível notar que as sequelas em sobreviventes são predominantemente no sistema urinário e sistema nervoso central (SNC). Os danos no SNC se manifestam como mudanças de comportamento, irritabilidade, mau humor, acometimento cognitivo ou até mesmo coma. A classe de fármacos agonistas do receptor nuclear PPAR gama, tem se mostrado eficaz na reversão de alterações cognitivas em modelos animais de Alzheimer, por seu caráter anti-inflamatório. Os objetivos gerais desse estudo são conferir a existência de dano cognitivo no modelo de sepse oriunda de pneumonia e investigar se há reversão desse dano pelo agonista de PPAR gama, rosiglitazona nos sobreviventes. No projeto desenvolvido a sepse foi induzida através da inoculação intratraquealmente de bactérias oportunistas *Klebsiella pneumoniae*, agente etiológico frequentemente observado em casos de sepse em pacientes imunodeprimidos internados em unidades de terapia intensiva. Cinco horas após a inoculação foi realizado o tratamento com a rosiglitazona e em seis horas a antibioticoterapia. Passadas 24 horas, foi avaliada a gravidade dos transtornos da sepse pelo escore clínico, com intervalo de 1 a 10, de acordo com os sinais apresentados pelos animais. A gravidade e mortalidade da sepse em machos foram menores no grupo tratado com rosiglitazona, assim como os níveis de citocinas pró-inflamatórias expressas no pulmão, apesar de não ter sido possível verificar diferença no dano cognitivo (avaliado 15 dias após o inoculo, para que houvesse resolução das complicações do procedimento e doença) e marcadores moleculares no tecido neural em modelos animais *swiss webster* machos. Já os resultados dos experimentos com fêmeas as taxas de sobrevivência e gravidade da doença se mantiveram as mesmas com e sem a rosiglitazona. No entanto, a rosiglitazona preveniu que o quadro de choque se agravasse nesses animais. Os dados referentes a memória espacial mostram que as fêmeas infectadas e recuperadas da sepse apresentavam acometimento cognitivo. Nestes experimentos, o grupo tratado com rosiglitazona apresentou uma tendência ao cometimento mais brando e possível neuroproteção. As análises de Western Blot apresentam um aumento na expressão de PSD95 e p38-fosforilado na região do hipocampo das fêmeas infectadas, o que indica que a lesão hipocampal seja causada pelo efeito da excitotoxicidade neuronal, pela via da MAPK p38. Concluimos que as alterações neurológicas foram constatadas com o nosso modelo de pneumonia causada pela *Klebsiella pneumoniae*, e a rosiglitazona desempenhou um papel neuroprotetor.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ROSIGLITAZONE ROLE IN SEPSIS ENCEPHALOPATHY OF PNEUMONIA ORIGINS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Gabriel Gutflen Schlesinger

Sepsis is the development of an infectious disease with enhanced inflammatory response. Even after pathogen clearance, the scenario may be set. Therefore, if not managed properly it can lead to shock, in worse cases to death. In the last 30 years Intensive Care Units have improved their treatment that mortality rates dropped down by 30% making it possible to study sepsis's aftermaths. Most common sequelae are in the Urinary System and Central Nervous System, in which could be manifested from mood disorders, cognitive impairment or even coma. In Alzheimer's disease models, Glitazones, PPAR-gamma agonists; have shown their potential to reverse cognitive impairment, because of their anti-inflammatory feature when activated. The main goal of this study is to check if there is cognitive impairment in mice models of sepsis evolved from pneumonia and if with Rosiglitazone treatment it was reverted or protective to the neuronal tissue. In this project we inoculated *Klebsiella pneumoniae*, the most common pneumonia etiological agent; intratracheally in healthy mice. After 5 hours, Rosiglitazone was administrated intraperitoneally and one hour later, antibiotics. 24 hours after infection, sepsis severity was evaluated by clinical scoring, ranging from 0-11. Although there was no difference in the disease severity between the treated and non-treated group Rosiglitazone prevented septic shock from worsening. We divided our findings into two blocks: Males and females. The sepsis severity and death rates were greater in male mice without the treatment, as the proinflammatory cytokines levels were higher in lungs compared with the treated group. We could not assess the cognitive impairment in these individuals. It was evaluated 15 days after inoculation, to avoid sickness behavior. There was no difference in biomarkers of the neural tissue between the groups. Whereas there was no change in the survival and severity rates, we could confirm cognitive deficits in the spatial memory between healthy and septic survivor mice. The treated group showed statistical tendency regarding neuroprotection, on this examination. Western-blotting analysis of the hippocampus showed an increased expression of PSD95 and phosphorylated-P38 in infected non-treated mice. These findings should be associated with neuronal excitotoxicity triggered by MAPK P38 pathways. Neurological alterations were found to be connected with *Klebsiella pneumoniae* induced pneumonia, and Rosiglitazone accomplished a neuroprotective role.

Índice	
FOLHA DE ROSTRO	ii
BANCA AVALIADORA	iv
DEDICATÓRIA	VIII
AGRADECIMENTOS	VIII
EPIGRAFE	VIIIi
RESUMO	VIII
ABSTRACT	ix
Lista de Tabelas e Figuras	xiii
Lista de Siglas	xiv
1 Introdução	1
1.1 Sepses: definição:	1
1.2 Sepses: epidemiologia:	4
1.3 Choque séptico:	5
1.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i> :	5
1.5 Pneumonia induzida pela <i>K. pneumoniae</i> :	6
1.6 Reconhecimento e resposta do patógeno pelo hospedeiro	7
1.7 Sepses evoluída de complicações da pneumonia:	8
1.8 Fisiopatologia da sepses:	8
1.8.1 Síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória:	9
1.8.2 Anormalidades na coagulação, disfunção mitocondrial e endotelial durante a sepses:	10
1.8.2.1 Mecanismos Anti-inflamatórios e imunossupressão	11
1.9 Acometimento neurológico e cognitivo durante a sepses e pós-sepses.	12
1.9.1 Dano cognitivo e neuroinflamação	12
1.9.2 Formação da memória e moléculas sinápticas	13
1.9.3 Excitotoxicidade	14
1.10 Tratamento durante a sepses::	14

1.11 A imunomodulação mediada pelo Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomo gama (PPAR gama)	15
2 Objetivos	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 Material e Métodos	20
3.1 Animais	20
3.2 Indução da infecção	20
3.3 Instilação	21
3.4 Tratamento	21
3.5 Avaliação Clínica	21
3.6 Coleta de amostras	22
3.7 Preparação das amostras e dosagem de proteínas	22
3.8 ELISA	22
3.9 Western Blotting	23
3.10 Ensaio Cognitivo:	24
3.10.1 Memória aversiva por meio do protocolo “Freezing”	24
3.10.2 Memória espacial pelo protocolo “Morris Water-maze”	24
3.11 Análise dos dados	24
4 Resultados	26
4.1 A rosiglitazona tem um efeito benéfico na sobrevivência e gravidade da doença nos animais	26
4.2 A rosiglitazona diminuiu a expressão de citocinas no BAL de animais sépticos	26
4.3 Avaliação dos marcadores inflamatórios sinápticos e cognitivos em machos	30
4.4 Análise dos ensaios preliminares com fêmeas inoculadas com <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
4.5 O efeito do tratamento com rosiglitazona sobre o quadro de choque séptico	33
4.6 O tratamento com rosiglitazona modula alterações em marcadores inflamatórios e sinápticos como visto nos animais infectados	36
4.7 Avaliações funcionais tardias sugerem um caráter neuroprotetor da rosiglitazona quando os animais foram desafiados pela <i>K. pneumoniae</i>	36
5 Discussão	40

6 Conclusões	49
7 Referências	50

Lista De Tabelas e Figuras

Tabela 1.1: SOFA.....	3
Figura 1.1: Composição dos fatores pró e anti –inflamatórios existentes na sepse.....	9
Figura 1.2: Fisiopatologia vascular presente na sepse responsáveis pela hipoperfusão tecidual	10
Figura 1.3: Mecanismos de modulação inflamatória via PPAR gama.....	19
Figura 4.1. A rosiglitazona aumenta a sobrevida e melhora os sinais clínicos dos animais machos infectados com <i>K. pneumoniae</i>	27
Figura 4.2. A rosiglitazona inibe a produção das citocinas Il-6 e TNF- α no pulmão de animais infectados com <i>K. pneumoniae</i>	28
Figura 4.3. Efeito da rosiglitazona nos níveis de MPO, IFN gama e IL-12 no cérebro de animais infectados com <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
Figura 4.4. Análise da expressão de sinaptofisina e PSD95 em cérebros de machos infectados com <i>K. pneumoniae</i> e tratados com rosiglitazona.....	30
Figura 4.5. Testes de memória em machos infectados com <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
Figura 4.6. Fêmeas desafiadas com <i>K. pneumoniae</i> e tratadas com antibiótico apresentaram maior sobrevivência e severidade maior na sepse desenvolvida.....	32
Figura 4.7. Análise da expressão de p38-fosforilado, PSD95 e β -actina em hipocampus das fêmeas.....	33
Figura 4.8. Camundongos fêmeas infectados com <i>K. pneumoniae</i> tratadas apenas com antibiótico (meropenem) durante a sepse desenvolvem sequelas cognitivas	34
Figura 4.9. A rosiglitazona não alterou a sobrevida nem a gravidade da doença porém preservou o agravamento do choque dos animais machos infectados com <i>K. pneumoniae</i> ...	35
Figura 4.10. A rosiglitazona inibe o aumento da expressão de PSD95 e não altera a expressão de sinaptofisina no hipocampo de fêmeas infectadas com <i>K. pneumoniae</i>	37
Figura 4.11. A rosiglitazona inibe o aumento da fosforilação da MAPK p38 desempenhando um papel anti-inflamatório no hipocampo de fêmeas infectadas com <i>K. pneumoniae</i>	37
Figura 4.12. Avaliação funcional da neuroproteção advinda do tratamento com a Rosiglitazona.....	38
Tabela 4.1: Resumo dos resultados encontrados no desenvolvimento do trabalho.....	39
Figura 5.1. Encefalopatia durante a sepse desencadeada pela pneumonia.....	48

Lista de Siglas

AMP	Adenosina monofosfato
AMPA	ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
APACHE	"Acute Physiology and Chronic Health Evaluation"
BAL	lavado bronco alveolar
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CARD	Domínio de recrutamento de caspase
CCR2	Receptor de quimiocinas C tipo 2
CFU	Unidades Formadoras de Colônia
CLP	ligadura e perfuração cecal
CLR	Receptores de lectinas tipo C
CPS	Cápsula polissacarídea
COX	ciclooxigenase
CREB	Proteína-elemento de resposta a ligação ao AMPcíclico.
CSF	líquido cerebroespinal
C3	componente 3 do sistema complemento
DMSO	dimetilsulfóxido
ELISA	"enzyme-linked immunosorbent assay"
ERK	quinases reguladas por sinal extracelular
EMA	"European Medicines Agency"
FDA	"Federal Drug Administration"
ICAM	molécula de adesão intercelular
IFN	interferon
IL-	Interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
LCN	lipocalina
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MPO	mieloperoxidase
NET	Redes extracelulares de neutrófilos
NFκB	Fator Nuclear kappa B
NLR	receptores tipo NOD
NMDA(R)	(receptor) N-metil-D-aspartato
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain

PAMP.....	Padrões moleculares associados a patógenos
PAR.....	Receptores de proteases-ativadas
PC.....	proteína C
PPAR.....	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomo
PPRE.....	elemento responsivo ao PPAR
PSD.....	densidade pós-sináptica
qSOFA.....	“quick Organ Failure Assesment”
RECORD.....	“Rosiglitazone Evaluated for Cardiovascular Outcomes in Oral Agent Combination Therapy for Type 2 Diabetes”
RICK.....	receptor de interação serina-treonina quinase
SIRS.....	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SNC.....	Sistema Nervoso Central
SOFA.....	“Organ Failure Assesment”
TBARS.....	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- β	Fator de transformação do crescimento
TLR.....	receptores do tipo <i>toll</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TZD.....	tiazolidinediona
UTI.....	Unidade de Terapias Intensivas
VCAM.....	molécula de adesão celular vascular

1. Introdução

1.1. Sepsis: definição:

Segundo a última definição estabelecida em 2016 por Singer e cols., sepsis é uma síndrome com alterações bioquímicas induzidas por algum agente infeccioso. As variáveis como fatores genéticos, moleculares, celulares e clínicos, são consideradas, mas não existe um padrão ouro para sua caracterização. Vários sinais e sintomas são associados a suspeita de infecção para que se feche o diagnóstico (1).

Em 1991, entrou-se em consenso que as definições iniciais de sepsis seria a suspeita de um quadro infeccioso associada a 2 ou mais alterações vistas durante a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (sigla em inglês, SIRS) como: temperatura superior a 38° C ou inferior a 36° C; batimento cardíaco superior a 90 por minuto; frequência respiratória superior a 20 por minuto ou inferior a 32 mm Hg PaCO₂ (4.3 KPa) e contagem leucocitária maior que 12 mil/mm³ ou inferior a 4 mil/mm³, ou ainda, 10% de neutrófilos imaturos (Band ou Stab). Esses critérios para identificação de sepsis são de aceitação unânime, apesar de não ter nenhuma relação direta com o possível quadro de infecção. Os critérios descritos acima serviram de base para a redefinição de sepsis (2) (1).

A sepsis portanto foi definida como uma disfunção orgânica que ameaça a vida pela resposta inflamatória desregulada do hospedeiro devido à infecção. Essa resposta não homeostática precisa ser reconhecida prontamente nos centros de atendimento uma vez que é potencialmente letal (1).

Singers e cols. estabeleceram os seguintes conceitos chaves:

- É a causa primária de óbitos por infecção, especialmente quando não reconhecida a tempo e tratada prontamente.

- É construída por fatores patogênicos e por fatores intrínsecos ao hospedeiro (sexo, ascendência, idade, comorbidades, ambiente e outros fatores genéticos) com potenciais complicações de agravamento com o decorrer do tempo. O que difere a sepsis das demais infecções é a resposta inflamatória descompensada e a presença de falência orgânica.

- A disfunção do órgão pode não ser detectada, portanto sua presença deve ser sempre considerada em qualquer paciente que apresente infecção. Um processo infeccioso desconhecido pode ser a causa de novas complicações no organismo. Qualquer disfunção de órgãos ou sistema sem causa aparente deve despertar a investigação de uma possível infecção.

- A manifestação clínica e biológica da sepsis pode ser modificada por qualquer condição pré-existente, como doenças crônicas ou agudas bem como, intervenções médicas ou terapêuticas.

- Infecções localizadas podem resultar em disfunções exclusivamente locais (restrita aquele órgão/sistema) sem desencadear uma resposta sistêmica exacerbada.

Diversos tipos de escalas foram elaborados para a avaliação da gravidade da disfunção de um órgão ou sistema. Relacionando quesitos como dados laboratoriais, achados clínicos e até intervenções terapêuticas mas evidenciaram uma inconsistência de resultados na busca de um escore que representasse a gravidade real do quadro. De qualquer forma, o sistema de pontuação predominantemente utilizado na clínica atualmente é o “Sequential Organ Failure Assesment” (SOFA – originalmente intitulado de “Sepsis-related Organ Failure Assesment”) (Tabela 1) (1).

As anomalias dos sistemas mensuradas pelo teste traduzem-se numa probabilidade de morte do grupo de pacientes, no entanto, cada paciente deve ser estudado de forma individual e basear sua chance de sobrevivência no grupo em que se enquadra é um procedimento errôneo (3). Contudo, aferições como gasometria arterial, contagem plaquetária, níveis de creatinina, níveis de bilirubina e hematócrito são cruciais, por isso, devem ser computados para um acompanhamento mais próximo do declínio do quadro. O método de triagem SOFA ainda não é amplamente conhecido fora dos círculos de terapia intensiva o que pode dificultar na triagem dos pacientes. Outros métodos de avaliação existem, mas não são de senso comum (3).

Para pacientes com suspeita de infecção, a validação do SOFA foi superior a 95%. Outro tipo de mensuração é o *qSOFA* (*quick* SOFA, SOFA rápido, tradução livre), no qual são avaliados apenas 3 quesitos: taxa respiratória, pressão sistólica ≤ 100 mmHg e alterações nos níveis de consciência. Esse último é sugerido no lugar da escala Glasgow de coma menor que 15(1).

As manifestações clínicas do sistema nervoso central (SNC) variam entre demência, letargia ou delírio. Os estudos de imagem (ressonância magnética, tomografia computadorizada e ultrassonografia) e exames funcionais (eletroencefalograma) não conseguiram encontrar um padrão lesional no tecido neural durante o período de internação. No entanto, o uso dessas ferramentas é de suma importância para se descartar complicações como isquemias, edemas ou quadros infecciosos no SNC. Decorridos três meses após a alta hospitalar, alguns trabalhos sugerem que há uma perda na massa cortical em sobreviventes da sepse (1) (4).

SISTEMA	ESCORE				
	0	1	2	3	4
Respiratório:					
PaO ₂ /FiO ₂ , mm Hg (KPa)	≥400 (53,3)	<400(53,3)	<300(40)	<200(26,7) com aporte respiratório	<100 (13,3) com aporte respiratório
Coagulação:					
Plaquetas, x10 ³	≥150	<150	<100	<50	<20
Hepático:					
Bilirrubina, mg/dL (μmol/L)	<1,2 (2,0)	1.2-1.9<20-32)	2,0-5,9(33-101)	6-11,9 (102-204)	>12(204)
Cardiovascular:	MAP ≥ 70 mm Hg	MAP < 70 mm Hg	Dopamina <5 ou dobutamina (qualquer dose)	Dopamina 5.1-15 ou epinefrina ≤ 0,1 ou norepinefrina ≤ 0,1	Dopamina >15 ou epinefrina > 0,1 ou norepinefrina > 0,1
Sistema Nervoso Central					
Escala Glasgow de Coma	15	13-14	10-12	6-9	<6
Urinário					
Creatinina, mL/d (μmol/L)	<1,2 (110)	1,2-1,9 (110-170)	2,0-3,4 (171-299)	3,5-4,9 (300-440)	>5,0 (440)
Débito urinário (mL/d)				<500	<200

Tabela 1.1: Parâmetros de análise para quantificação do SOFA(1)

1.2. Sepsis: epidemiologia:

Em um estudo realizado no período de outubro de 2003 a março de 2004, verificou-se que os custos totais do tratamento da sepsis no Brasil foram maiores que U\$ 9.600 por paciente, enquanto o custo diário por paciente foi de U\$ 934 tanto na rede pública quanto na particular. Pacientes admitidos em hospitais públicos e privados tiveram o tempo de internação próximos a 10 dias (5). Com base nesses dados, ao fazermos extrapolações para os valores atuais encontramos os valores, U\$ 11.040 e U\$ 1.074,10 respectivamente.

Um levantamento feito em 2011 no Brasil constatou que cerca de um terço dos leitos das UTIs de centros médicos e hospitais particulares e públicos estavam ocupados por pacientes com sepsis grave e choque séptico. Os pacientes pontuavam em média 7,3 no escore SOFA na admissão da UTI. O aumento da mortalidade e a gravidade dos pacientes foi atribuído ao fato dos pacientes terem adquirido um quadro infeccioso enquanto internados na UTI (infecção hospitalar) e à inadequação do tratamento principalmente o atraso para administração da primeira dose de antibióticos. A taxa de mortalidade foi de 55% dos casos (na região Sudeste foi de 51.2%, Centro-Oeste: 70%, Nordeste: 58.3, Sul: 57.8% e Norte: 57.4%). Além disso, instituições com menor disponibilidade de recursos tiveram maior mortalidade. Estudos realizados em países desenvolvidos mostram uma taxa de 30%. (6).

A ocorrência do quadro de sepsis grave se dá principalmente por complicações do quadro de pneumonia (causa mais comum) responsável por metade dos casos, seguido por infecções intra-abdominal e do trato urinário. As amostras de sangue nem sempre apresentam um patógeno, já que em apenas um terço das amostras é possível isolar algum patógeno. Os agentes infecciosos Gram positivos mais corriqueiros são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e dentre os Gram negativos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella sp.* Levantamentos clínicos recentes revelam que 62% dos pacientes tiveram origem infecciosa Gram positiva, 47% Gram negativos e 19% de origem fúngica (7).

Em um levantamento realizado observou-se que a predição para internação de pacientes que apresentavam SOFA de 0 a 1 não foram diferentes das obtidas na mesma faixa de escore por outros métodos de avaliação. O aumento do escore (SOFA e qSOFA) é diretamente proporcional as taxas de internação e as taxas de mortalidade observadas em pacientes que apresentavam qSOFA ≥ 2 foram 2,5 vezes maiores que as dos pacientes com qSOFA < 2 , nessas mesmas faixas de comparações, as taxas de internação foram 2,1 vezes maior (8).

1.3. Choque séptico:

Pela antiga definição, a evolução da sepse se dava em três estágios: sepse (SIRS associada a infecção), caso o paciente apresentasse hipotensão, hipoxia, elevados níveis de lactato ou qualquer biomarcados e disfunção orgânica, seu quadro era definido como sepse grave e se mesmo após a ressuscitação com fluidos o quadro de hipotensão perdurasse era classificado como choque séptico. (9). A incidência de sepse grave prevalece mais em indivíduos da primeira e terceira idade, mais em homens que mulheres e em negros que caucasianos (10, 11).

A nova definição de sepse redefiniu os três estágios das caracterizações, ao eliminar o estágio de sepse grave. Portanto o quadro de sepse (infecção associada a SOFA ≥ 2) evolui diretamente para choque séptico, quando o paciente apresentar sepse e alterações na pressão arterial média < 65 mmHg, níveis de lactato maiores que 2 mMol/L (1).

A lesão aguda renal, oligúria, aumento dos níveis de creatinina e necessidade de transplante também podem acontecer como consequência da sepse. Outras consequências como paralisação de movimentos do íleo, elevação dos níveis de aminotransferase sérica, controle glicêmico, trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada, disfunção adrenal e síndrome do doente eutireoidiano podem ser encontradas nos pacientes com choque séptico (12).

1.4. *Klebsiella pneumoniae*:

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* é um membro da família Enterobacteriaceae, com formato de bastão, Gram negativa, fermentador de lactose; que pode apresentar capsula e possui 78 sorotipos capsulares (antígeno K). Sua hiperviscosidade é considerada um fator de virulência pelo aumento da produção da cápsula polissacarídea (CPS), que é tido como o fator virulento mais importante na biologia da *Klebsiella spp.*

A presença da CPS espessa na superfície celular protege a *K. pneumoniae* da opsonização e fagocitose por macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e células dendríticas. As cepas mais virulentas, mesmo após serem fagocitadas por neutrófilos, conseguem escapar dos mecanismos intracelulares de eliminação bacteriana e se deslocar para diversos sítios no corpo. As formas que não apresentam CPS deflagram mecanismos inflamatórios no hospedeiro, enquanto a CPS induz mecanismos anti-inflamatórios como a inibição de interleucina (IL)-8 por atuar na via receptores do tipo toll (TLR) 2, TLR4 e vias dependentes de NOD1(13).

A *K. pneumoniae* é uma bactéria oportunista por geralmente afetar aqueles com comprometimento no sistema imune. A colonização por esta bactéria ocorre a partir de

infecções nosocomiais. Nestes casos, já foram isoladas do trato urinário, sistemas respiratório e sanguíneo. Elas formam um biofilme de estrutura tridimensional que permite a aderência das bactérias à superfície de mucosas e materiais hospitalares. O biofilme é composto por uma matriz polimérica extracelular que protege o consórcio bacteriano da ação de antibióticos, estresses ambientais e dos ataques do sistema imune, aumentando assim a viabilidade das bactérias (14).

Outras proteínas da membrana externa podem contribuir para a virulência e resposta imune da *K. pneumoniae* além do polissacarídeo, o antígeno-O, o lipídeo-A, componentes do lipopolissacarídeo (15); as adesinas, as porinas membranares e sideróforos (15) (13).

Quando estabelecida a infecção, a *K. pneumoniae* pode causar no hospedeiro abscessos hepáticos piogênicos, meningites, fascite necrozante, endoftalmite e pneumonia grave. Esses isolados bacterianos apresentam resistência a carbapenemases e/ou B-lactamases, tornando a eliminação do agente etiológico ainda mais difícil (13).

1.5. Pneumonia induzida pela *K. pneumoniae*:

O epitélio do sistema respiratório é a rota primária de patógenos no hospedeiro. Como já mencionado anteriormente, a *K. pneumoniae* é frequentemente a causadora de infecções hospitalares, variando desde infecções urinárias até bacteremia grave e pneumonia com altos níveis de mortalidade e morbidade. Infecções pulmonares com esse agente etiológico são de curso clínico rápido com complicações por abscessos pulmonares e envolvimento multilobular, resultando em um período curto para o início da antibioticoterapia efetiva (16).

Depois de instalada no epitélio pulmonar, apesar de ser um patógeno de reprodução extracelular, a *K. pneumoniae* entra nas células epiteliais formando um reservatório bacteriano ou um sítio infeccioso onde a bactéria está protegida das ações dos antibióticos (16).

Existe uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de CPS da cepa e a capacidade de invadir as células do epitélio pulmonar. O mecanismo de internalização das bactérias é uma forma de contenção da infecção pelo hospedeiro. As células do epitélio pulmonar produzem constitutivamente o componente 3 do sistema complemento (17). Esta produção aumenta quando as células foram estimuladas pela presença da bactéria. Vale ressaltar que a produção de C3 do sistema complemento é modulada pela quantidade e tipo de CPS que a cepa apresenta. Uma vez que a *K. pneumoniae* é opsonizada com C3, esta é eliminada dos pulmões por macrófagos alveolares ou pelos neutrófilos. Quando as bactérias estão opsonizadas o recrutamento destas células é mais eficiente do que quando não opsonizadas (16).

Fagócitos mononucleares desempenham funções importantes no combate a bactérias. Nessa população, os tipos celulares mais comuns são: monócitos, células dendríticas e macrófagos. De uma maneira geral, cada uma dessas se dividirá em subpopulações especializadas em expressão de certas moléculas que farão o mosaico da resposta pró-inflamatória para a eliminação da bactéria (18).

O reconhecimento de PAMPs (“Padrões moleculares associados a patógenos”) pode ser feito por receptores como: TLR, receptores C-lectinas, Gene-1 induzíveis do ácido retinóico, domínios de oligomerização de ligação nucleotídica. A ativação desses receptores resulta na supertranscrição de genes pró-inflamatórios acarretando no início da resposta inata (10).

Os mesmos receptores também reconhecem moléculas endógenas de células injuriadas (“damage-associated molecular patterns” ou alarminas, como as proteínas do grupo B1, S100, RNA e DNA extracelular, histonas). As alarminas também são liberadas em lesões estéreis como trauma, dando origem ao conceito de que o início da falência múltipla dos órgãos não é necessariamente diferente de doenças não infecciosas (12).

Os mecanismos de rompimento de barreira do epitélio pulmonar pela *K. pneumoniae* e disseminação para a corrente sanguínea ainda necessitam ser estudados. Os neutrófilos, células dendríticas e mastócitos já foram associados com a translocação de patógenos através da barreira epitelial e endotelial. Sabe-se que a resposta mediada por “CCAAT/enhancer-binding protein δ ”, TNF- α , interferon-gama, fator de estimulação de colônias de granulócitos, IL-22, “myeloid-related protein-14” protegem o hospedeiro da *K. pneumoniae*. Por outro lado, as moléculas como IL-1 β , receptor associado a kinase M e trombospondina-1 contribuem para a disseminação da infecção (19).

1.6. Reconhecimento e resposta do patógeno pelo hospedeiro

Os TLRs e NLR (receptores do tipo NOD) reconhecem o patógeno pelo domínio estrutural rico em repetições de leucina, mesmo que o desencadear de suas vias diferem um do outro. O LPS é reconhecido pelo TLR, um receptor expresso na face externa da membrana celular, ou na face externa de endossomos. Utilizam o domínio Toll Il-1 para desencadear sua cascata, enquanto o peptídeo glicano, presente na parede celular bacteriana, tem seus metabolitos reconhecidos por meio de NLR, receptor presente no citosol de células epiteliais ou sentinelas apresentadoras de antígeno. O NLR necessita do recrutamento de caspase para que desencadeie sua via de sinalização (20).

O receptor de quimiocinas C tipo 2 (CCR2) ativado, presente em monócitos, contribui para a migração celular tanto da medula óssea quanto do sangue ao sítio de infecção. Quando os macrófagos são ativados via outros receptores que não esse tendem a não produzirem

iNOS ou TNF- α , comprometendo a resposta adequada no combate ao patógeno ali presente (18).

A expressão do NOD1 e NOD2 é mediada por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α dependendo do tipo celular. De uma maneira geral, bactérias Gram-negativas são reconhecidas via NOD1, enquanto Gram-positivas por NOD2 que por sua vez recrutam o receptor de interação serina/treonina quinase (RICK), pelo recrutamento do domínio de recrutamento de caspase (21) (20).

1.7. Sepsis evoluída de complicações da pneumonia:

As taxas de mortalidade são elevadas em 10% em indivíduos saudáveis, quando há bacteremia sanguínea, enquanto nos imunodeprimidos essa razão eleva-se a 30%. Isso acontece provavelmente porque o LPS desencadeia a produção de mediadores inflamatórios diversos como as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (15). Se a inflamação ocorrer de forma exagerada, há a possibilidade da evolução para a sepsis. Isto acontece porque mesmo após a remoção total bacteriana, esses fatores induzem sinais como febre, taquicardia e hipotensão. Outros fatores citotóxicos como radicais livres, enzimas lisossomais, situações como extravasamento do conteúdo intravascular para o meio extravascular também ocorrem, levando a quadros de edema (22).

1.8. Fisiopatologia da sepsis:

Atualmente a sepsis é reconhecida por ativar ambos os tipos de resposta pro- e anti-inflamatória, com alterações na fisiologia dos sistemas cardiovascular, neuronal, sistema autônomo, hormonal, bioenergética, metabólica e vias de coagulação. Todas com grande importância no prognóstico (12).

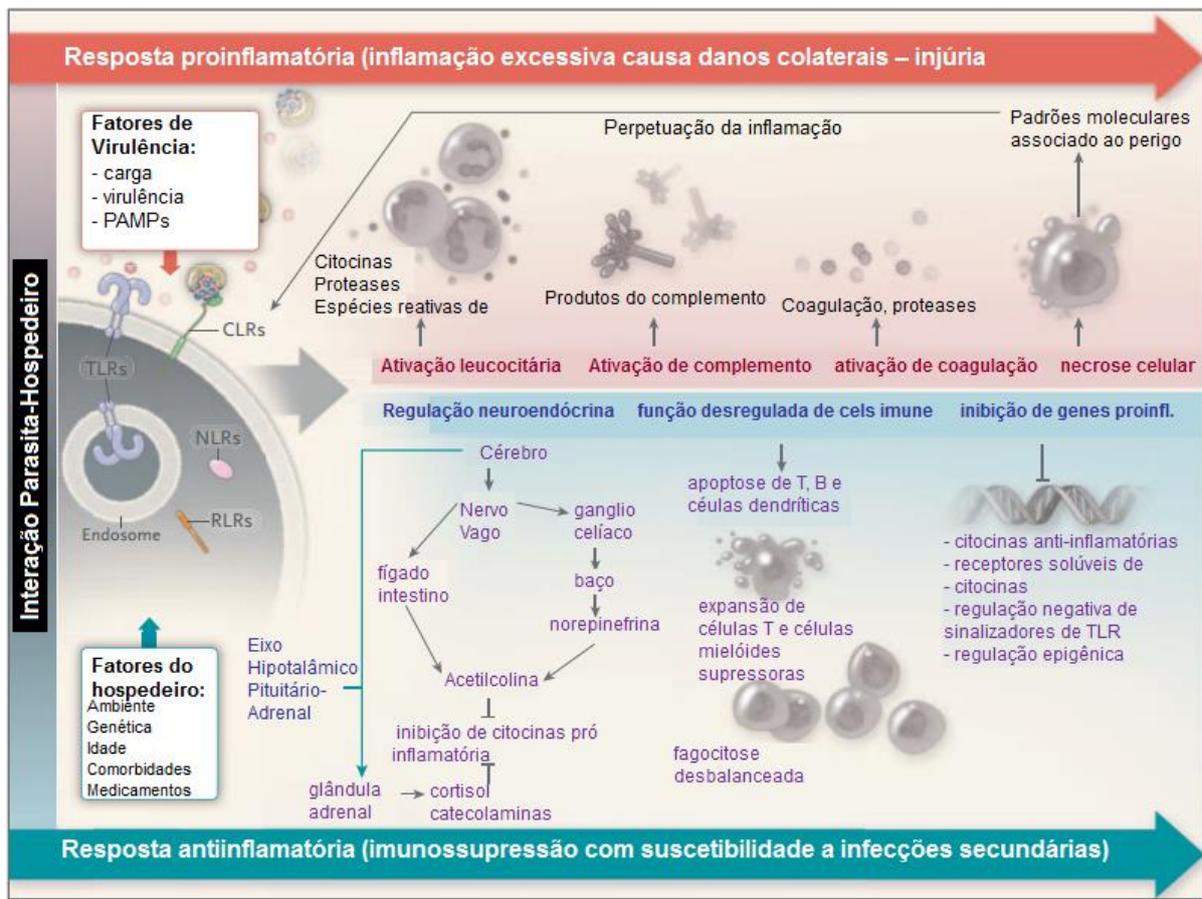


Figura 1.1: Composição dos fatores pró e anti-inflamatórios existentes na sepsis. A virulência, carga patogênica e o reconhecimento de PAMPs via TLR, CLR (receptores de lectina tipo C) e TLR deflagram a resposta pró-inflamatória através da ativação leucocitária, da coagulação e sistema complemento além de necrose celular levando ao dano tecidual. A resposta anti-inflamatória depende de fatores intrínsecos ao hospedeiro como idade, predisposições genéticas, o microambiente tecidual, comorbidades e uso de medicamentos. A resposta anti-inflamatória é modulada pela regulação neuroendócrina, pelo eixo hipotálamo-pituitário-adrenal, função desregulada das células imunes, desencadeando a apoptose de células com perfil pró-inflamatório e pela inibição de genes pró-inflamatórios e expressão de citocinas anti-inflamatórias, por exemplo. Adaptado de (12).

1.8.1. Síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória:

No começo do entendimento sobre a sepsis, assumia-se que as características sépticas fossem resultantes da exacerbação inflamatória. Com o aprimoramento dos estudos, postulou-se que a resposta inflamatória inicial desencadeava a “síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória”. Entretanto, até o momento é claro que a infecção dispara uma resposta complexa envolvendo fatores anti- e pró- inflamatórias (figura 1.1) que contribuem para a eliminação do foco infeccioso e recuperação tecidual enquanto pode favorecer o aparecimento de lesões nos órgãos e infecções secundárias (12).

A resposta irá depender da carga patogênica e sua virulência, e fatores próprios do hospedeiro como já mencionados. Em geral, reações pró-inflamatórias são responsáveis pelos

efeitos colaterais teciduais, enquanto a resposta anti-inflamatória (importantes para limitar a lesão tecidual e orgânica) são consideradas a causa de suscetibilidade a infecções secundárias (12).

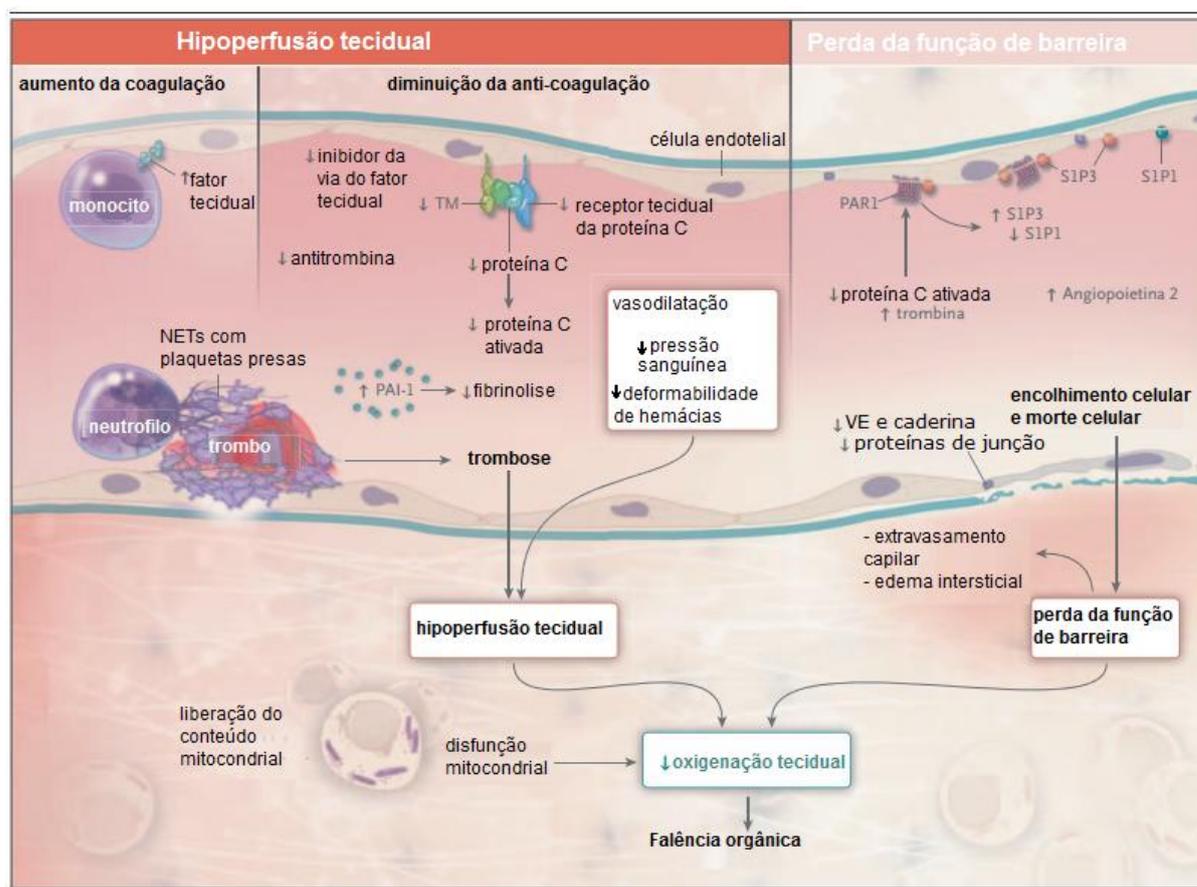


Figura 1.2: Fisiopatologia vascular presente na sepse responsáveis pela hipoperfusão tecidual. A adesão monocitária ao endotélio capilar, assim como a formação de NETs com plaquetas dificultam a perfusão tecidual. A vasodilatação causa a queda na pressão sanguínea e na deformabilidade de hemácias, estes causaram a hipoperfusão tecidual. A redução da ativação da proteína C, assim como a diminuição da expressão de caderinas e proteínas de junção celular causaram a perda da função de barreira. Esta disfunção na barreira e a hipoperfusão tecidual comprometem a oxigenação tecidual que tem por consequência a falência orgânica. Adaptado de (12)

1.8.2. Anormalidades na coagulação, disfunção mitocondrial e endotelial durante a sepse:

No curso da sepse acontecem alterações vasculares, a hipoperfusão tecidual que é agravada pela vasodilatação, hipotensão e, enquanto a deformação das hemácias circulantes facilita o aparecimento de trombos (figura 1.2). Não só isso, mas as vias de coagulação estão ativadas (mesmo sem quadro hemorrágico). A perda da homeostase de fatores teciduais e descompensações de mecanismos anticoagulante são consequências da atividade reduzida de vias endógenas de anticoagulação, como a proteína C ativada, antitrombina e via de fatores

teciduais). A liberação do inibidor do fator-1 de ativador de plasminogênio (PAI-1) está aumentada, causando a desregulação de fibrinólise. Os receptores da proteína C reativa vão se tornando escasso no endotélio capilar o que incapacita sua ativação. Não só isso, mas a formação do trombo é facilitada pelo aparecimento de redes extracelulares de neutrófilos (NETs). A oxigenação tecidual também é diminuída pela perda de função de barreira do endotélio oriunda da perda de função vascular da caderina, alterações na ligação endotelial celular, altos níveis de agiopoietina-2 e distúrbios no balanço entre o receptor fosfato esfingosina-1 (SIP-1) e -3. A oxigenação em níveis intracelulares também fica comprometida devido ao dano mitocondrial do estresse oxidativo (23) (12).

As alterações mitocondriais oriundas do estresse oxidativo desregulam a oxigenação celular. As mitocôndrias também secretam alarminas no espaço extracelular como DNA mitocondrial e formil-peptídeos, que ativam neutrófilos e causam dano tecidual (12). Em resumo, a inflamação pode causar a disfunção do endotélio vascular, seguido pela morte celular e perda da integridade de barreira, sucedendo o edema subcutâneo e generalizado.

1.8.2.1. Mecanismos Anti-inflamatórios e imunossupressão

Os fagócitos ao assumirem um fenótipo anti-inflamatório promovem o reparo tecidual enquanto células T reguladoras e células supressoras oriundas da medula também contribuem. Ademais, mecanismos neurais podem inibir a inflamação. Outro reflexo neuroinflamatório, acontece através do nervo vago ao tronco encefálico, do qual o nervo vago eferente ativa o nervo esplênico no plexo celíaco, resultando na liberação de norepinefrina no baço e secreção de acetilcolina pelas células T CD4+. Essa liberação tem como alvo os receptores $\alpha 7$ nos macrófagos tendo a resultante inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (24) (12).

1.9. Acometimento neurológico e cognitivo durante a sepse e pós-sepse.

O dano cognitivo é uma disfunção neuropsicológica, medida pela alteração na capacidade de memória, atenção, tempo de pensamento, habilidade visuoespacial e função executiva. Dos dados epidemiológicos do dano cognitivo gerado pela sepse pulmonar variam entre 4-62% de pacientes e com as sequelas presentes de 2 a 156 meses após o recebimento de alta da clínica (25).

Os sobreviventes da sepse grave têm apresentado assincronismo na função cerebral quando comparados a indivíduos saudáveis, em magnetoencefalografias. Tende-se a atribuir essa disparabilidade da função cognitiva no reconhecimento de objetos à atrofia e à alteração de função de certas regiões cerebrais, como a redução do volume hipocampal desses sujeitos acometidos, assim como alterações no fluxo sanguíneo que irriga o tecido neural (25). Os

exatos mecanismos desses acometimentos ainda não foram muito bem elucidados, mas acredita-se que haja alterações na barreira hemato-encefálica causadas pelo estresse oxidativo que pode levar a disfunção mitocondrial. São manifestadas através de alterações estruturais e perda de atividade de enzimas mitocondriais que por consequência causam disfunção energética cerebral, além de alterações em neurotransmissores (17) (26).

Os “Excitatory Amino Acid Transporters” são bombas transmembranares que realizam o transporte do meio extracelular para o intra no SNC. Estes desempenham um importante papel ao promover a recaptação de glutamato pelos neurônios impedindo que seus níveis tóxicos sejam atingidos. Esse processo tem uma demanda alta de energia por se tratar de simportadores que atuam principalmente no sentido anti-gradiente. Para que o processo ocorra é necessário que 3 Na⁺ e 1 H⁺ são transportados para o meio intracelular enquanto o K⁺ é transportado para o meio extracelular. A regulação do gradiente celular é feita pela Na⁺/K⁺-ATPase, com a presença das desregulações citadas acima esse sistema fica comprometido e ainda mais agravado pela ativação da resposta imune exacerbada (17) (26) (27).

1.9.1. Dano cognitivo e neuroinflamação

O dano cognitivo dos sobreviventes da sepse pode ser tanto transitório quanto permanente. Em muitas doenças neurodegenerativas há o depósito da proteína β-amiloide no meio intracelular ou o truncamento de proteínas recém-expressas, ou ainda algum “problema” no carregamento vesicular. Esses fenômenos contribuem ainda mais para um ambiente neuronal hostil, propiciando a morte neuronal. Em diversos estudos, vários tipos de memória estão sujeitas a lesão, memórias mais primitivas como a aversiva, vista em casos de malária não cerebral; memória espacial e mais sensível como a de longa e curta duração. Nos humanos isso pode ser avaliado por meio de exames rápidos relacionados à fala, identificação e realização de desenhos, em modelos animais faz-se necessário o uso de algum utensílio para aferição cognitiva (28, 29).

Em indivíduos saudáveis, a microglia (células do sistema imune residentes do SNC, são tidas como autosuficientes durante a idade adulta) está quiescente e inativada, pela presença do fator de transformação tumoral β (TGFβ), apesar disso, desempenha função sentinela ao retrair e estender seus processos a procura de alterações de seu entorno. Durante processos neurodegenerativos crônicos, esta tem seu fenótipo alterado e um aumento na expressão de antígenos em sua superfície celular. Além disso, macrófagos são encontrados em maior número no tecido neural. Após a injúria ou infecção, a resposta inflamatória sistêmica interage por 3 vias com o sistema nervoso central, quando o insulto é na cavidade torácica ou abdominal a sinalização é através do nervo vago aferente para a produção e secreção de

citocinas, enquanto o ramo eferente modula o evento pela secreção de acetilcolina (figura 1.2). O segundo caminho é pela entrada de mediadores inflamatórios na corrente sanguínea que por sua vez ativam macrófagos e outras células imunes da região periventricular do SNC, onde não há a barreira hematoencefálica. O terceiro mecanismo é por via de mediadores inflamatórios ou moléculas próprias de patógenos que interagem diretamente com o endotélio cerebral, que transpassa a barreira hematoencefálica pela indução de mediadores lipídicos em particular prostaglandina E2 (24).

Para que haja a descompensação funcional do sistema de memória/aprendizado, além de alterações no nível molecular, as sequelas da sepse se manifestaram também no nível organizacional celular no córtex e hipocampo em sinapses excitatórias e em maior escala no volume dos hipocampos, onde é possível visualizar uma atrofia do esquerdo em relação aos controles (29).

1.9.2. Formação da memória e moléculas sinápticas

A sinapse é estabilizada pela ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDARs) e receptores ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA). As sinapses podem sofrer alterações, serem dissolvidas ou mantidas dependendo da existência de um estímulo. Portanto para que a memória seja consolidada a sinapse deve ter uma manutenção molecular apropriada. O aumento do cálcio pré-sináptico propicia a fusão de vesículas neurotransmissoras e liberação destas na fenda sináptica.(30)

Os circuitos de memória hipocampal-lobo temporal medial é associado ao reconhecimento de objetos e cenários. A estrutura e composição molecular no hipocampo tem suma importância no aprendizado e formação de memória. A formação hipocampal recebe a informação de fontes neocorticais e as processa em projeções sequenciais, modelo clássico do circuito tri-sináptico hipocampal, conectada a neurônios granulares do giro dentado a células piramidais das regiões CA1 e CA3.

O BDNF desempenha funções relacionadas à plasticidade sináptica, e níveis reduzidos deste resultam em disfunções neurológicas. A sinaptofisina é uma proteína associada a formação, transporte e liberação de vesículas no neurônio pré-sináptico(30) (31, 32).

O acúmulo de proteínas pós-sinápticas é uma característica anatômica sináptica. Isso foi primeiramente visto como uma região mais eletrondensa em sinapses excitatórias por composição de complexos de densidade pós-sináptica (PSD), que após serem examinadas por proteômica chegou-se a uma variedade de mais de 1000 proteínas neste complexo. A mais abundante é a “Post Synaptic Density 95” (PSD95), que forma nanoagregados de tamanhos e

números variados. A força da sinapse está associada ao tamanho de sub-regiões nos terminais pós-sinápticos (31).

O PSD95 é uma proteína móvel de função organizadora da sinalização pós-sináptica nos receptores glutamatérgicos, canais iônicos, sinalização enzimática e proteínas de adesão. Ele ainda controla a transmissão sináptica, plasticidade neuronal, memória e aprendizagem (31).

1.9.3. Excitotoxicidade

A neurotoxicidade mediada por glutamato é chamada de excitotoxicidade. E, tem potencial de causar a morte neuronal. O glutamato é o principal neurotransmissor no SNC adulto. Em situações fisiológicas o glutamato participa da plasticidade neuronal e guia de expansão axonal. No meio extracelular, por exemplo, na fenda sináptica é reconhecido pelo receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR) agindo como ponto central ao detectar e processar os sinais glutamatérgicos no meio intracelular (30). O glutamato induz o influxo de cálcio nos neurônios. Em situações patológicas a extrusão do cálcio intraneuronal pela bomba Na/Ca²⁺ está debilitada o que dificulta o balanceamento iônico. A sobrevivência neuronal é mediada pela atividade glutamatérgica, dentre outros fatores. Quando a quantidade de glutamato é tão alta que extravaza da fenda sináptica, NMDAR (-ES) extrassinápticos são ativados, como nos quadros de isquemia. Alguns estudos têm diferenciado esses receptores quanto as funções extrasináptica e sinápticos, neurodegenerativas ou protetoras respectivamente (33).

Particularmente, os NMDAR-S ativam a via das MAPK como a ERK, disparando o aumento nuclear de cálcio, conseqüentemente ativa o fator de transcrição CREB levando à produção de BDNF, propiciando a longevidade do neurônio. Enquanto a via da MAPK p38 dispara o sinal para a via de morte neuronal (34).

1.10. Tratamento durante a sepse:

O manejo primário do paciente deve priorizar a ressuscitação respiratória em casos mais graves, além da mitigação da disseminação da infecção. A ressuscitação necessita do uso de terapia intravenosa como vasopressores, com ventilação mecânica, quando necessária (35, 36). O monitoramento do paciente além do uso de adjuvantes vasoativos está em constante debate quanto ao seu uso na clínica (34, 35).

A escolha da antibioticoterapia varia com o foco e origem da infecção, assim como o local da infecção (casa, asilos ou hospitais), histórico médico, e padrões de suscetibilidade microbiana local. O atraso ou a intervenção inapropriada podem acarretar o agravamento do cenário (35, 36). Portanto, a escolha da terapia antibiótica deve ser iniciada o mais breve o

possível. Ainda não foi caracterizado se a combinação de vários antibióticos ou o uso de um único antibiótico é o mais apropriado. Os antifúngicos são recomendados para casos de candidíase invasiva. O uso de diferentes agentes antimicrobianos é recomendado para casos de *Pseudomonas spp* (35, 36).

O curso da terapia consiste em mover o paciente para centros de terapia intensiva, para aporte clínico e monitoramento por 6 horas e realizar a checagem se os aparelhos de aporte são cruciais, caso não mais o sejam, realizar o seu desligamento. O desescalonamento das terapias de grande espectro deve evitar o aparecimento de organismos resistentes, e o desmame foca em minimizar os riscos de toxicidade ao fármaco. (35, 36).

Existe uma nova tendência estratégia terapêutica em que não foca apenas no patógeno, mas também no hospedeiro ao tentar ativar fatores intrínsecos, essa abordagem é chamada de terapias direcionadas ao hospedeiro (37).

O único imunomodulador recomendado atualmente é a hidrocortisona (200-300 mg por dia; até o dia 7 de internação ou até que o aporte vasopressor não seja mais necessário) para pacientes com choque séptico refratário (persistência do quadro de pressão artéria baixa, apesar da reposição de fluidos e administração de vasopressores) (35, 36).

O uso de anti-inflamatórios não esteroidais para o tratamento de pneumonia ainda é alvo de debate. A administração de ibuprofeno em pacientes sépticos dos quais 50% foi evolução de pneumonia, mostraram uma melhora respiratória apesar de não haver alteração nas taxas de mortalidade. (37)

A administração intravenosa de imunoglobulina tem sido associada a um efeito potencial benéfico, apesar de seu uso não ser ainda protocolo clínico. Outros estudos tem sugerido o uso de estatinas para melhora das sequelas sépticas e infecções graves, porém dados clínicos ainda são necessários para que estes fármacos sejam associados à clínica (1).

O uso de agentes hipoglicemiantes como as glitazonas, podem ter um efeito anti-inflamatório similar ao dos corticosteroides em pacientes com “community acquired pneumonia”. Estudos que utilizaram glibenclamida mostraram alguma diminuição nas taxas de mortalidade em pacientes com mieloidose grave do que em pacientes não diabéticos ou pacientes que se tratavam com outros agentes anti-glicemiantes (37).

1.11. A imunomodulação mediada pelo Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomo gama (PPAR gama)

Existem 48 tipos de receptores nucleares em humanos, com funções distintas e especificidade celular. São fatores de transcrição ligante-dependentes envolvidos no desenvolvimento e homeostase fisiológica frente a uma alteração ambiental. Há 3 isotipos de

PPAR: α , β/δ , e γ . O primeiro é vastamente expresso no fígado desempenhando funções relacionadas à oxidação de ácidos graxos, metabolismo de lipoproteínas, gliconeogênese, biossíntese de corpos cetônicos. O PPAR- β/δ está relacionado a termogênese adaptativa e oxidação de ácidos graxos no músculo estriado. O PPAR gama participa na diferenciação de fibroblastos em adipócitos, desempenha funções anti-glicemiantes e anti-inflamatórias quando ativados. Os agonistas dos PPARs são conhecidos como glitazonas, seus agonistas sintéticos que contêm a tiazole-2,4-diona (tiazolidinediona, TZD) Nos últimos 20 anos o PPAR gama teve sua importância muito difundida para o tratamento de diabetes-2 (38) (39).

O PPAR gama com sítio de ligação em formato de “Y” que permite uma ligação flexível do ligante. Devido a essa promiscuidade estrutural, o PPAR gama é um participante ativo de diversas modificações que ocorram na célula, desde a absorção de nutrientes pela célula até alterações metabólicas. Apesar de desempenhar uma função anti-inflamatória, ao inibir a ativação gênica como por exemplo: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IL-21, VCAM, ICAM, TNF- α , iNOS, COX-2, TGF- β e IFN-gama; nunca foi usado amplamente na terapia clínica como agente anti-inflamatório. (38)

Desde 2007, existe uma polêmica entorno da utilização das glitazonas como terapia anti-glicemiante, devido a estudos que associavam dano cardiovascular ao uso desses medicamentos. Devido a essas disputas realizaram ensaios e meta-análises sob o nome “Rosiglitazone Evaluated for Cardiovascular Outcomes in Oral Agent Combination Therapy for Type 2 Diabetes” (RECORD) para avaliação real dos danos. Foi demonstrado que a rosiglitazona possuía os mesmos efeitos adversos quanto outras terapias antiglicemiantes como as sulfonilureias e metformina nos quesitos cardiovasculares e óbitos. A rosiglitazona apenas apresentou um risco elevado para infarto do miocárdio. Portanto, tanto o “Federal Drug Administration” (FDA), quanto a “European Medicines Agency” (EMA) restringiram o uso do medicamento (40). Porém, em 2013, o FDA após reavaliar os resultados do RECORD liberou o uso da rosiglitazona como terapia antiglicemiante em casos de diabetes tipo 2. A patente da rosiglitazona foi aberta no ano de 2012 (41).

No núcleo o PPAR gama forma um heterodímero com o receptor nuclear retinóico X receptor α (RXR α) em sítios específicos. Com a presença de seus agonistas o PPAR gama altera sua conformação e se liga ao DNA genômico. Os antagonistas de PPAR, coativadores e corepressores alteram sua atividade. A atividade do PPAR também pode ser modulada pelo elemento responsivo ao PPAR (PPRE), região dos genes alvo onde o PPAR se liga após a formação do heterodímero, e por vias pós traducionais como fosforilação, acetilação, glicosilação, SUMOilação e ubiquitinação A atividade do PPAR gama também pode ser modulada por proteínas de sinalização intracelular como as MAPK (38, 39).

Por estar presente em diferentes tipos celulares, mesmo que em baixas concentrações intracelulares, quando ativados os PPAR gama deflagram alguma alteração como já mencionado. Em macrófagos por exemplo, que, ao migrarem para o tecido adiposo começam a secretar TNF- α , quando o PPAR gama é ativado remodela o perfil M1, pró-inflamatório do macrófago diferenciado para o perfil M2, com características mais imunomodulatória assim como as células T reguladoras diminuindo a inflamação tecidual e outros tipos celulares (38, 42).

Os mecanismos anti-inflamatórios são propiciados por interações proteína-proteína do PPAR gama com o NF κ B (“Nuclear Factor κ light-chain enhancer of activated B cells”) (figura 1.3) ou competição de cofatores de transcrição; ao exportar o NF κ B do núcleo para o citosol. Além de modificações translacionais incluindo a ubiquitinação pela E3 ligase que tem como consequência a degradação do NF κ B. Em interações proteína-DNA causada pela SUMOilação do PPAR gama interfere de forma indireta na transrepressão deste segundo fator por meio de outros eventos competitivos. Os agonistas do PPAR gama também podem atuar por vias não relacionadas somente a ele como a indução de apoptose em células B malignas e de leucemia pró-mielocítica aguda, além de impedir o crescimento de outros cânceres, fosforilação de MAPK, inibição da expressão de TGF- β de miofibroblastos durante a fibrose pulmonar. Todos esses efeitos são muito bem descritos em modelos *in vitro* porém *in vivo* é impossível o “knock-out” do PPAR gama. Mesmo com a administração dos antagonistas do receptor como o GW9662 se vê o efeito em vias independentes do PPAR gama, muitas vezes esses efeitos só são observados com a administração de doses muito altas dos agonistas do receptor (38, 42, 43).

A administração de agonistas de PPAR gama em camundongos submetidos a sepse, observou-se um efeito protetor no pulmão dos animais, além de inibir o edema pulmonar, o recrutamento neutrofílico e a produção de citocinas quimiotáticas para leucócitos (44). Trabalhos do nosso laboratório (dados não publicados) descreveram a diminuição no infiltrado celular do lavado bronco alveolar (BAL) em 24 h em animais instilados com a *K. pneumoniae* e tratados com rosiglitazona 5 h após o inóculo. Foi visto também uma diminuição nas unidades formadoras de colônia (UFC), nestes animais tratados com a rosiglitazona em relação aos não tratados. As inibições ocorridas são sobre a produção de IL-6, IL-1 β , TNF-alfa, além de outras citocinas via inibição do NF- κ B e c-jun. Outro papel desempenhado pela ativação do PPAR-gama em modelo de animal séptico por ligadura e perfuração do ceco (CLP) foi a indução de NETs na cavidade peritoneal (45), propiciando assim uma maior eliminação bacteriana. Enquanto neste mesmo modelo acontecem alterações vasculares, o tratamento com a rosiglitazona manteve a densidade capilar da

microvascularização cerebral, a diminuição no rolamento e adesão celular nos capilares e impediu a possível migração para o tecido cerebral inflamado, melhorando os quadros de disfunção na microcirculação cerebral (46).

Por essas características anti-inflamatórias, estudos recentes têm obtido êxito ao observar a reversão de dano cognitivo em modelos animais de Alzheimer. Nesses estudos, o agonista de PPAR gama (pioglitazona) restaurou os níveis de BDNF, uma neurotrofina essencial para a sobrevivência, a manutenção e o crescimento neuronal, que está desregulada no Alzheimer (47) (48).

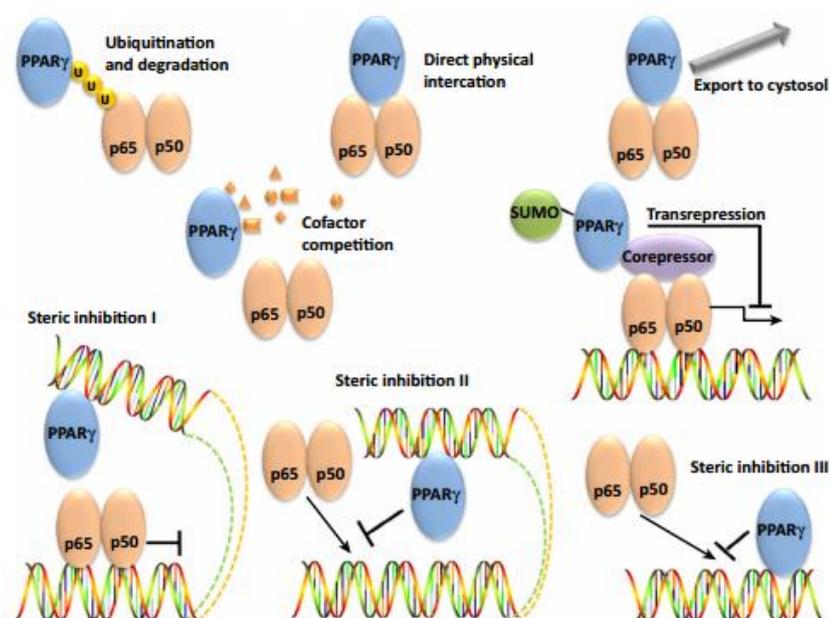


Figura 1.3: Mecanismos de modulação inflamatória via PPAR gama. De forma direta: A interação com o NFκB (p65 e p50) de maneira direta ao induzir sua degradação pelo complexo NFκB/p65 através da ubiquitinação (u); interação direta com o NFκB de forma total, tanto p65+p50; ao exportar o NFκB do núcleo para o citoplasma, não deixando que se ligue aos sítios de transcrição; através da competição de cofatores comuns aos dois e pela SUMOilação ao realizar a transrepressão por se associar a corepressores. De forma indireta: o PPAR gama pode se relacionar de diversas formas o início da transcrição efetuada pelo NFκB por transrepressão em sítios de início de transcrição de genes pró-inflamatórios. O PPAR gama ainda tem a capacidade de se ligar a sítios específicos de genes inflamatórios inibindo sua transcrição. (38)

Pelas características anti-inflamatórias apresentadas pelas TZDs, além da reversão do dano cognitivo em outras patologias que não a sepse, tem-se como hipótese a reversão do acometimento cognitivo como os recuperados devido ao efeito dessa classe farmacológica.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os sinais clínicos e alterações cerebrais e pulmonares no modelo experimental de encefalopatia séptica oriunda de pneumonia e suas sequelas, além de avaliar o efeito da rosiglitazona.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar a mortalidade e o escore clínico dos animais infectados com *Klebsiella pneumoniae*.
- b) Quantificar a produção de citocinas no pulmão e tecido neural dos animais infectados com *Klebsiella pneumoniae*.
- c) Analisar a expressão dos marcadores de transmissão sináptica, sinaptofisina e PSD95 no hipocampo dos animais infectados.
- d) Constatar e comparar o acometimento cognitivo subsequente à pneumonia.
- e) Analisar o papel da rosiglitazona nos fenômenos observados em todos os itens acima descritos.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos das linhagens *Swiss webster* e C57/BL6 machos pesando entre 20 e 30 gramas fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ. Os animais foram mantidos em isoladores ventilados (Gabinete Biotério mod.EB-273, Insight, Brasil) no biotério do Pavilhão Ozório de Almeida até o momento do experimento, com livre acesso a água e ração, sendo submetidos a um ciclo de 12 h de claro/escuro. Os animais receberam uma dose de vermífugo (Drontal Puppy - Bayer) por via oral (gavagem) e foram utilizados uma semana após o tratamento. Os protocolos utilizados nesta tese foram aprovados pelo comitê de Ética no Uso de animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA nº 0260/05-FIOCRUZ).

3.2. Indução da infecção

A cepa *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (Schroeter) Trevisan (ATCC®700603™) utilizada foi cedida pela Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar do laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (CCBH/LPIH-IOC-FIOCRUZ/RJ) a bactéria foi cultivada em meio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*) por 17 a 24 horas à 37° C. Após a inoculação os tubos foram centrifugados a 4750 rpm por 15 minutos na centrífuga ALLEGRA X-15R BECKMAN COULTER. Em seguida, descartamos o sobrenadante e ressuspendemos as bactérias em 1 mL de solução salina estéril (0,9%). Coletamos uma alíquota e a diluímos de 10 a 20 vezes em um poço na placa de 96 poços COSTAR para que se atinjissem o volume total do poço de 100 µL. A leitura na leitora de placa por espectrometria foi feita a 650 nm. A densidade óptica de 0,1 equivale a 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL.

Em seguida, eram realizadas 10 passagens das bactérias em camundongos. Quinhentos bilhões de (5x10⁸) UFC/mL de bactérias foram instiladas intratraquealmente em camundongos C57/BL6, o baço foi removido 24 h após macerado e estriado em placas do meio ágar Macconkey, para seleção das estirpes mais virulenta, e em seguida colocada para crescer em BHI por 24 horas à 37° C.

A mesma quantidade utilizada nos camundongos C57/BL6 para instilar a bactéria foram usadas para os camundongos *Swiss webster* machos, nas fêmeas instilávamos 6x10⁸ CFU/mL.

3.3. Instilação

Os camundongos do tipo *Swiss webster*, de ambos os sexos, de peso entre 18 a 25 g foram anestesiados com Isoflurano ventilado pelo equipamento vaporizador calibrado na dosagem de 3,0 CAM (concentração alveolar mínima). Com a utilização de material cirúrgico a traqueia dos animais é perfurada e injetados 50 µL de solução salina estéril ou suspensão com as bactérias. Ao final do procedimento os animais foram suturados com agulhas 3-0 Vycril, com disponibilidade de água e ração *ad libitum*

3.4. Tratamento

Cinco horas após o procedimento cirúrgico os animais foram tratados intraperitonealmente (ip.) com rosiglitazona (0,5mg/Kg) da Cayman Chemical, ou o veículo, dimetilsulfóxido (DMSO) (0,015mL/Kg), seis horas após a instilação de bacterias todos os grupos das fêmeas recebem o antibiótico meropenem (10 mg/Kg) por via ip. Todas as administrações eram diluídas separadamente em salina e administrados 200µL para cada animal.

3.5. Avaliação Clínica

A avaliação clínica foi feita por meio do uso de um escore adaptado do modelo SHIRPA (“SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College and Royal London Hospital phenotype assessment”), com o intuito de saber qual a gravidade da doença em 24 h. Examinamos os seguintes critérios: alteração respiratória (a respiração do animal deve se manter contínua e inalterada, sem assovios ou estalos. A realização de arfadas ou suspiros demonstra alteração nesse parâmetro. Outra característica observada é a posição do animal, quando o animal apresenta alteração respiratória ele adquire uma postura arqueada), lacrimação/fechamento de pálpebra, pilo ereção, temperatura corporal, interesse pelo ambiente (o animal é posto em um recipiente e seu comportamento normal consiste em caminhar, cheirar, tocar com suas vibríceas as superfícies ali presente e/ou se por em posição ereta ao se apoiar apenas com as patas traseiras), atividade locomotora (sua marcha deve ser contínua e rápida, não apresentando letargia em seus movimentos), alerta (escape ao toque), força ao agarrar (o animal deve conseguir se manter suspenso por no mínimo 10 segundos ao se segurar com as patas dianteiras uma haste lisa como a parte traseira de rodos raspadores de culturas de células), taxa respiratória após o esforço físico, turgor. Os animais sadios não apresentavam nenhuma alteração nesses parâmetros, enquanto os doentes apresentavam. Cada alteração dos padrões normais ganhavam 1 ponto. Ao final temos um escore máximo de dez pontos.

Consideramos os escores da seguinte forma: de 1 a 3, sepse leve; de 4 a 7, sepse moderada; superior a sete, sepse grave.

3.6. Coleta de amostras

Após as avaliações clínicas os animais foram eutanasiados com isoflurano e em seguida foi feita a instilação de 1 mL de salina intratraquealmente e para a realização do lavado bronco alveolar (2). O BAL foi centrifugado a 1500 g/10 min. E o sobrenadante armazenado a -20°C para dosagem de citocinas.

A perfusão extracorpórea foi feita com solução salina 0,9% com EDTA 20 mM com a velocidade de 20/ 5 minutos pelo equipamento Minipuls3 GILSON. Em seguida foi feita a remoção do córtex e do hipocampo dos indivíduos. As amostras foram acondicionadas em gelo seco seguidas do armazenamento a -86°C.

3.7. Preparação das amostras e dosagem de proteínas

As amostras do cérebro foram maceradas em diferentes soluções dependendo de seu destino: como tampão RPPA acrescido de inibidores de proteases e fosfatases para “Western-Blotting”, ou em tampão fosfato 1X (900 mL de água deionizada e 100 mL de PBS 10X – 80g de NaCl, 2g de KCl, 14,4g de Na₂HPO₄, 2,4g de KH₂PO₄ em 1L de água destilada deionizada; pH: 7,4) com triton 0,1% para as amostras triadas para ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”). Para a dosagem de proteínas contidas nas amostras usamos o *kit* Pierce™ BCA Protein Assay Kit da ThermoFisher Scientific. Pipetamos 25 µL de albumina fornecida pelo fabricante em diluição seriada para montagem da curva padrão. O mesmo volume do sobrenadante das amostras foi colocado nos poços. Adicionamos a solução dos reagentes A e B (1:500) do *kit* em todos os poços contendo a curva padrão ou as amostras. Protegemos a placa da luz e incubamos a 37°C por 30 minutos. A densidade óptica foi detectada a 562 nm pelo espectrofotômetro Spectra MAX 190. As leituras foram aferidas pelo software SoftMax Pro 5.2

3.8. ELISA

Os anticorpos de captura foram diluídos em tampão fosfato 1x sem a proteína carreadora. As placas de 96 poços da CORNING foram cobertas com 50 µL por poço do anticorpo de captura. A placa foi tampada com parafilme e encubada pernoite a 4 °C. No dia seguinte o anticorpo de captura foi descartado e a placa lavada 4 vezes com o tampão de lavagem (PBS 1X e TWEEN20 0,05%). A etapa seguinte consistiu no bloqueio dos poços por 1 h com o

tampão de bloqueio (PBS 1X e BSA 1%). Em seguida, as placas foram lavadas 4 vezes com o tampão de lavagem.

Adicionamos 50 μ L do anticorpo recombinante por poço para obtenção da curva padrão, assim como a mesma quantidade para o sobrenadante de cada amostra, incubando-se a placa pernoite.

Logo após, desprezamos os conteúdos dos poços que foram lavados 4 vezes com o tampão de lavagem. Foi depositado em cada poço o anticorpo de detecção por 1 hora. Em seguida, descartamos o anticorpo e lavamos a placa oito vezes. Adicionamos estreptavidina nos poços deixando-a reagir por 20 a 60 minutos protegida da luz à temperatura ambiente, até que a curva reaja. As placas são lidas a 450 nm pelo espectrofotômetro Spectra MAX 190. As leituras de densidade óptica foram aferidas pelo software SoftMax Pro 5.2

Todos os anticorpos foram diluídos conforme as orientações dos fabricantes (BD Biosciences ou R&D Systems)

3.9. Western Blotting

As placas de vidro do kit da BIORAD foram bem limpas, completamente secas e montadas no suporte para polimerização de géis. O gel de resolução a 9% (4,7 mL de Acrilamida Bis; 1,9 mL de tampão de resolução – Trizma Base, Água deionizada, pH: 8,8; 115,5 μ L de Persulfato de Amônio 10%; 150 μ L dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%; 8,12mL de água deionizada; 7 μ L de TEMED) foi preparado em um tubo Falcon de 50 mL. Em seguida é passado para a armação das placas de vidro antes de ser polimerizado. Adicionamos 0,5 mL de isopropanol e aguardamos até que o gel polimerize. Em seguida é preparado o gel de empilhamento (875 μ L de Acrilamida Bis; 1,75 mL tampão de empilhamento – Trizma Base, água deionizada, pH: 6,8; 52,5 μ L de APS 10%; 70 μ L de SDS 10%; 4 mL de água deionizada e 6 μ L de TEMED). Retiramos o isopropanol e adicionamos o gel de empilhamento antes de polimerizar.

As amostras foram aliquotadas para que fosse aplicado 50 μ g de proteína em cada poço acrescidas de tampão de amostra (3g de trizma base; 40 mL de água deionizada; 40mL de glicerol; 8g de SDS, 20 mL de Beta-mercapto etanol; 250 μ g de azul de bromofenil.). Antes de serem aplicadas, foram aquecidas a 99°C, rapidamente centrifugadas e aplicadas no gel na cuba de eletroforese da BIORAD com tampão de corrida 1x (Trizma Base 6g; Glicina 144 g; SDS 10 g e água deionizada para completar 1 L) sob voltagem de 90V/~1h .

A transferência das proteínas do gel para as membranas de PVDF foi feita por meio de banho semi seco ECL TE 77 GE Lifesciences a ordem de 45 mA/45'. O gel, as membranas e os filtros foram umidificados com tampão de transferência. Em seguida incubamos as

membranas em tampão de bloqueio (TBS 1X – 2,8 g de Tris HCl, 0,25 g de trizma base, 8,76 g de NaCl, 800 mL de água deionizada em pH: 7,4 - com 1 mL de Tween20 (TBST) +5% albumina sérica bovina) por 2 horas.

Os anticorpos primários foram preparados na concentração 1:1000 para incubar as membranas de 2 horas a 16 horas com TBST em agitação. Foram feitas três lavagens de 10 minutos das membranas. Para a revelação das bandas incubamos as membranas em soluções de anticorpos secundários da LI-COR, conforme o fabricante sugere: 1:20.000. Novamente as membranas foram lavadas com o intuito de se retirar os anticorpos excedentes, em 3 lavagens de 10 minutos em agitação. O equipamento Odyssey da LI-COR foi utilizado para realizar a leitura das membranas.

3.10. Ensaios Cognitivos:

Os animais foram mantidos no biotério por 2 semanas para que quando estivessem curados e livres de sepse, fossem avaliados para o acometimento cognitivo. O condutor dos experimentos desconhecia quais grupos estavam sendo avaliados.

3.10.1. Memória aversiva por meio do protocolo “Freezing”

O animal é colocado em uma caixa para explorá-la e depois de 3 minutos leva um choque por 600 μ A por 300 ms e no dia seguinte é posto no mesmo ambiente. Se explorá-lo significa que possui um acometimento nessa memória. O tempo de latência esperado nos animais controles foi de pelo menos 75 segundos.

3.10.2. Memória espacial pelo protocolo “Morris Water-maze”

Os animais foram colocados durante 1 minuto em um aparato cujo volume é de 300 L na qual existe uma plataforma submersa que não conseguiam visualizá-la. Durante 4 dias deviam memorizar o caminho para a plataforma, com auxílio de figuras geométricas de diferentes cores nas paredes da sala e no dia 5, dia do teste com duração de 1 minuto, a plataforma foi removida e quantificado o tempo em que ficaram no quadrante onde estaria a plataforma.

3.11. Análise dos dados

O desempenho dos animais nos testes cognitivos foi analisado com o programa Any-Maze v. 4.7. Após a compilação dos dados obtidos pelo escore clínico, e demais análises colorimétricas foram posteriormente analisados estatisticamente. Os resultados foram representados como média e erro padrão da média (EPM) e avaliados estatisticamente pelo teste T de Student ou por meio da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Neuman-

Keuls Student. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As curvas de sobrevivência foram expressas como percentagem de camundongos vivos, observados num período de 0-144 h. Para a curva de sobrevivência foi utilizado o teste estatístico Mantel-Cox-logrank, no qual valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

Após a indução da sepse evoluída de pneumonia e tratamento dos animais com a rosiglitazona e antibioticoterapia, avaliamos a sobrevida, gravidade da doença, expressão de moléculas inflamatórias e sinápticas e integridade das faculdades cognitivas dos animais.

4.1. A rosiglitazona tem um efeito benéfico na sobrevida e gravidade da doença nos animais

As primeiras avaliações foram feitas em machos. Para que ocorresse o desenvolvimento da sepse no grupo e existisse uma taxa de sobrevida compatível com o modelo de sepse após inoculação, foi instilado 5×10^8 CFU e realizado o acompanhamento dos sinais clínicos. Nós observamos que a sobrevida dos animais não tratados foi de 30%, enquanto a dos animais infectados tratados com rosiglitazona foi de 70%. Os grupos controle não tiveram óbitos (Figura 4.1a). Também observamos que o grupo infectado não tratado teve sepse moderada, ao passo que o grupo tratado desenvolveu sepse leve (figura 4.1b).

4.2. A rosiglitazona diminuiu a expressão de citocinas no BAL de animais sépticos

Após as quantificações de sobrevida e escore dos animais foram feitas análises na expressão de citocinas inflamatórias no BAL desses animais em 24 horas. observou-se que os animais infectados e não tratados com a rosiglitazona apresentavam níveis mais altos de IL-6 e TNF- α do que os grupos tratados com a rosiglitazona (Figura 4.2 a e b, respectivamente).

Como a sepse é um acontecimento que engloba todos os tecidos do organismo e para haver alterações cognitivas devem acontecer alterações moleculares e estruturais no tecido cerebral, averiguarmos a presença de mieloperoxidase (MPO) e citocinas, no cérebro dos animais, porém, não houve diferença estatística entre os grupos infectados e não infectados e o tratamento também não causou alteração estatisticamente relevante (figura 4.3 a, b e c; respectivamente).

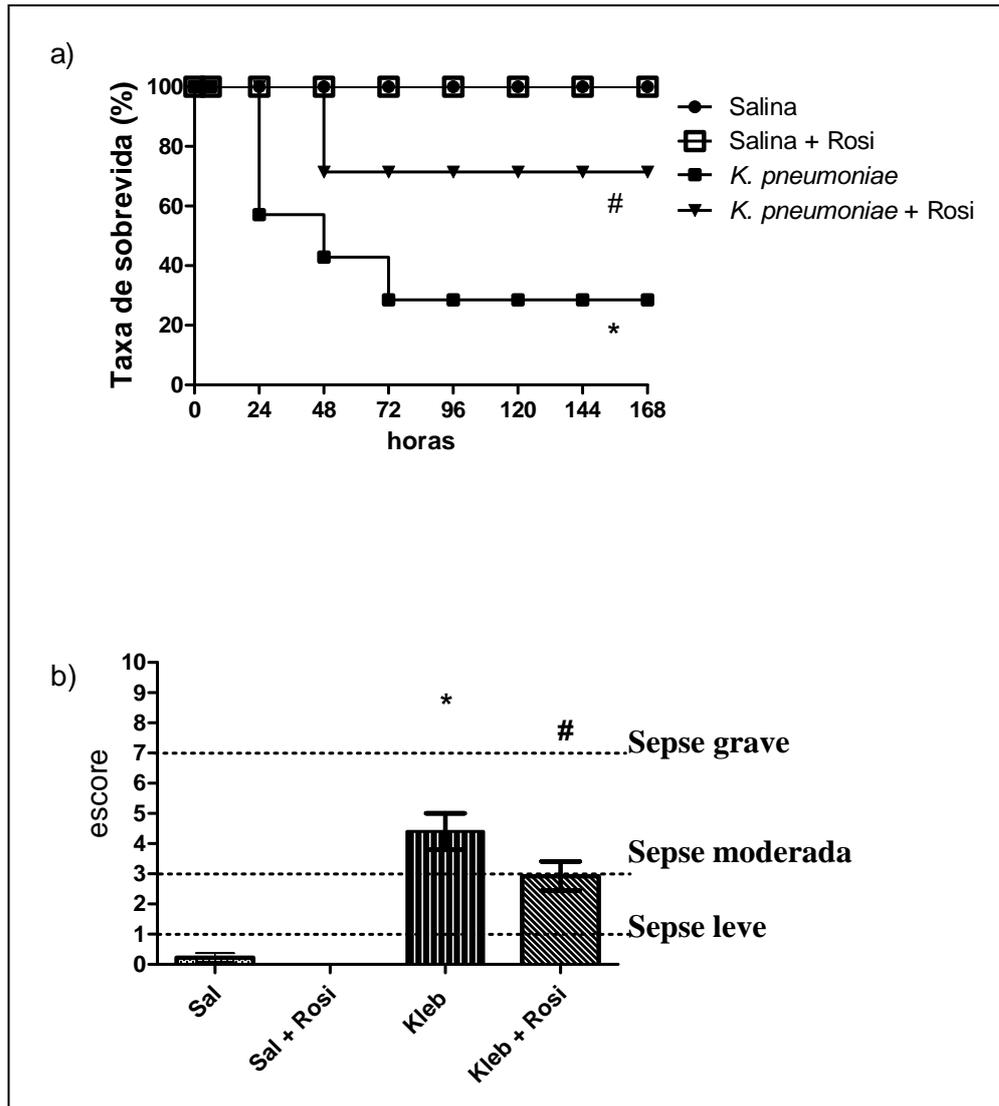


Figura 4.1. A rosigitazona aumenta a sobrevivência e melhora os sinais clínicos dos animais machos infectados com *K. pneumoniae*. Os camundongos foram submetidos à instilação intratraqueal com 5×10^8 CFU de *K. pneumoniae* e foram tratados com rosigitazona (Rosi) 5 horas após o estímulo. (a) A taxa de sobrevivência foi avaliada por sete dias e expressa por porcentagem. (b) O escore do aparecimento dos sinais clínicos foi avaliado 24 h após a infecção. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina (). (#) $p < 0,05$ em relação ao grupo Kleb. n. dos grupos 20, 20, 60, 60; Sal, Salina; Sal + Rosi, Salina e rosigitazona, Kleb, *K. pneumoniae* e Salina; Kleb + Rosi, *K. pneumoniae* e rosigitazona). respectivamente.

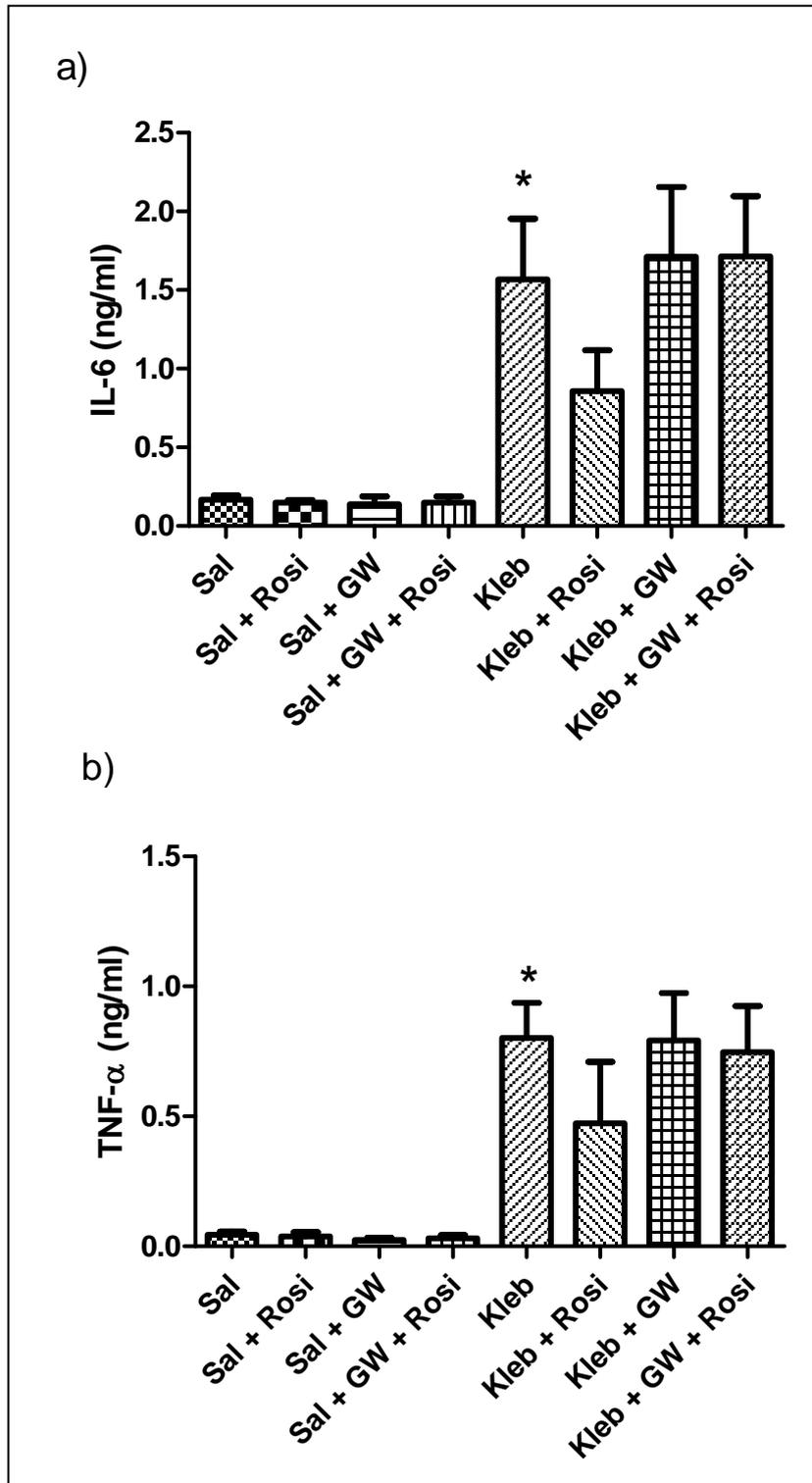


Figura 4.2 A rosiglitazona inibe a produção das citocinas IL-6 e TNF- α no pulmão de animais machos infectados com *K. pneumoniae*. Dosagens das concentrações de citocinas, IL-6 (a) e TNF- α (b); nos pulmões de machos. GW9662(GW) é o antagonista do PPAR-gama. Os dados representados como média + erro padrão da média. (*) $p < 0,05$. 10, 10, 14, 16; S, Sal, Salina; Sal Rosi, Salina e rosiglitazona, Kleb, *K. pneumoniae* e Salina; Kleb Rosi, *K. pneumoniae* e rosiglitazona).

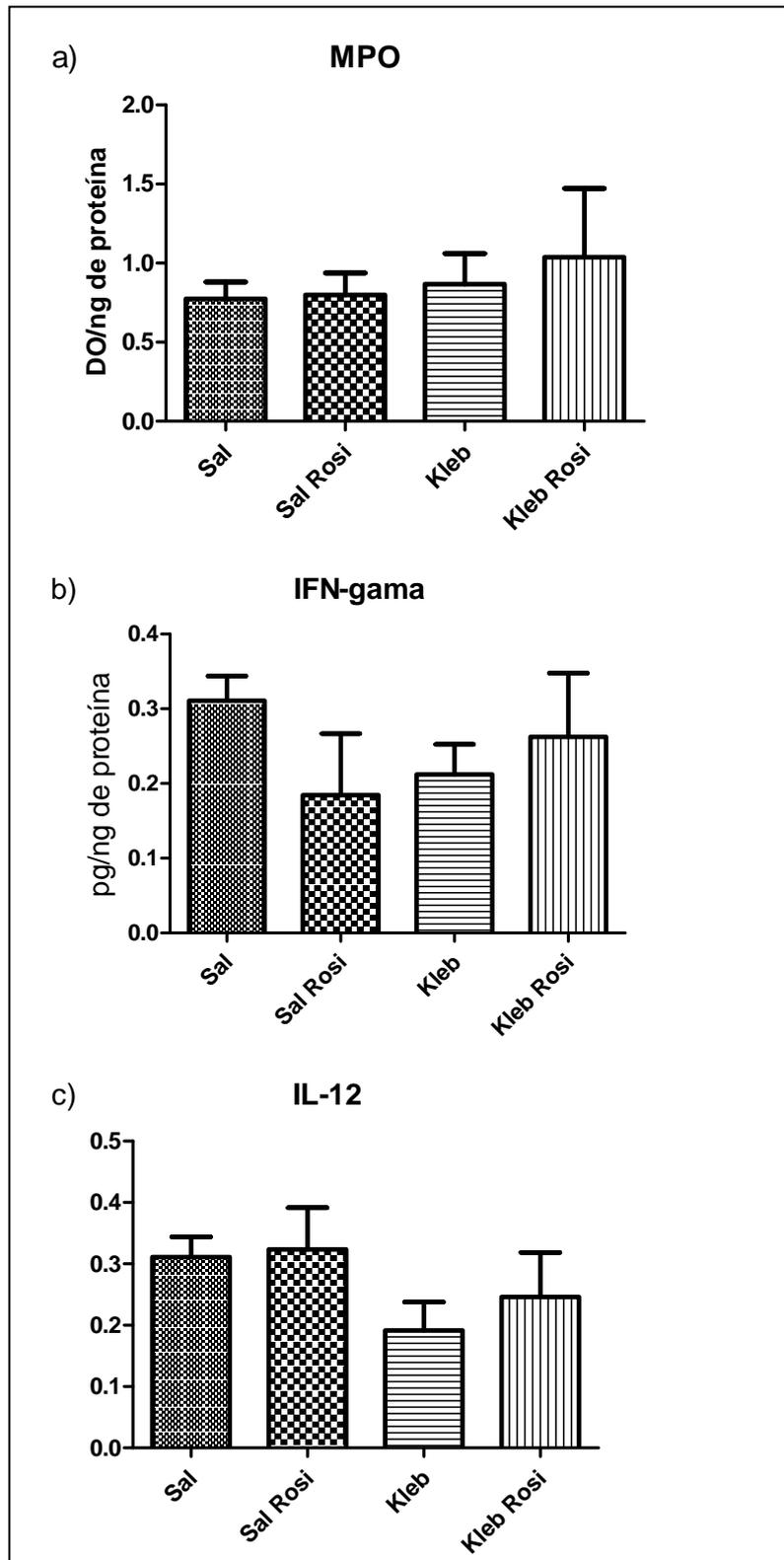


Figura 4.3 Efeito da rosiglitazona nos níveis de MPO, IFN gama e IL-12 no cérebro de animais machos infectados com *Klebsiella pneumoniae*. Dosagens atividade de mieloperoxidase (a) e citocinas (IFN gama e IL-12, (b) e (c) respectivamente) em córtex de machos infectados com *Klebsiella pneumoniae* e tratados com rosiglitazona. (a das dosagens de MPO 5, 5, 8, 6; citocinas 5, 5, 8, 8; Sal, Salina; Sal Rosi, Salina e rosiglitazona, Kleb, *K. pneumoniae* e Salina; Kleb Rosi, *K. pneumoniae* e rosiglitazona). Dados representados como média + erro padrão da média.

4.3. Avaliação dos marcadores inflamatórios sinápticos e cognitivos em machos

Nas quantificações da expressão de marcadores sinápticos, PSD95 e sinaptofisina, nesses animais não houve diferença entre os grupos controle e infectado (figura 4.4). Prosseguiu-se para avaliações funcionais da memória aversiva (Figura 4.5a) não houve diferença nos grupos e esta é tida como mais preservada por depender de duas estruturas a amígdala e o hipocampo, conduzimos testes de memória espacial (Figura 4.5b), por ser mais sensível, por não envolver a amígdala no processo de formação desta memória. Porém, nesta também não houve diferença, mostrando que mesmo após 15 dias não houve dano cognitivo nesses animais corroborando com as análises moleculares realizadas em 24 horas de citocinas e marcadores inflamatórios, não havendo nenhuma alteração mensurável de caráter significativo posteriormente. As complicações da sepsse levaram ao óbito os machos que possivelmente viriam a ter acometimento cognitivo.

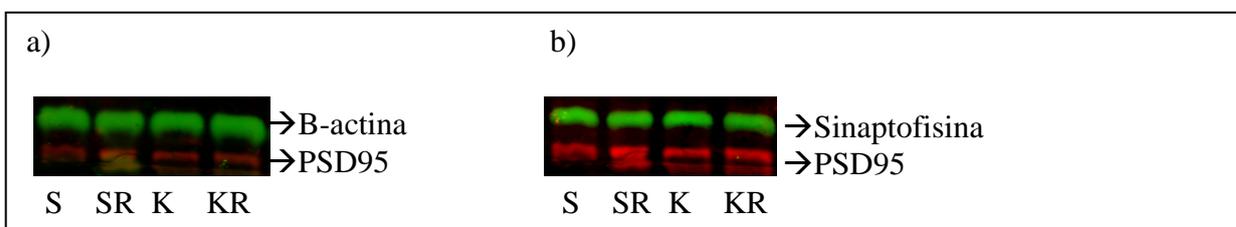


Figura 4.4. Análise da expressão de sinaptofisina e PSD95 em cérebros de machos infectados com *K. pneumoniae* e tratados com rosiglitazona. B-actina (a) (verde) e PSD95 (vermelho) e sinaptofisina (verde) e PSD95 (b) de cérebro de machos. Ordem das amostras: S, Salina; SR, Salina e rosiglitazona, K, *K. pneumoniae* e Salina; KR, *K. pneumoniae* e rosiglitazona (Imagem representativa. Número de indivíduos nos grupos >3).

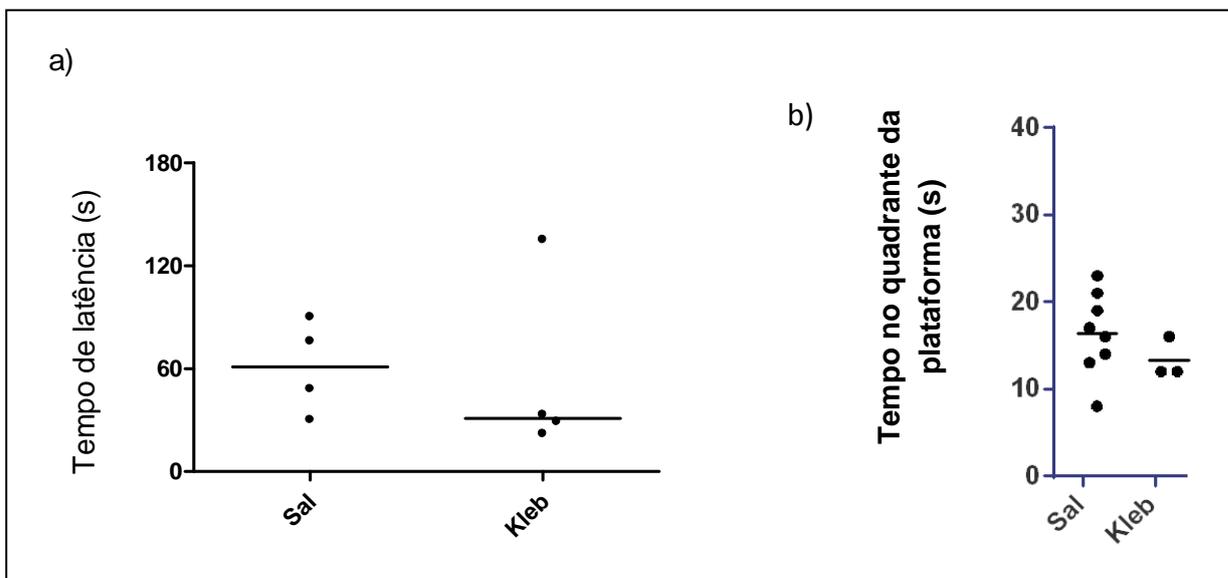


Figura 4.5. Testes de memória em machos infectados com *Klebsiella pneumoniae*. (a) Avaliação de memória aversiva *Freezing* e labirinto aquático de Morris (b). Camundongos machos foram submetidos à instilação intratraqueal com 5×10^8 CFU de *K. pneumoniae*. Os animais já recuperados da infecção (15 dias após a inoculação) tinham sua capacidade de memorização avaliada. (n dos gráficos: em (a) 4 e 4 com repetições dos exp. (b) 8 e 3 com repetições do experimento. Ordem Sal: Kleb). Dados representados como valores individuais e mediana.

4.4. Análise dos ensaios preliminares com fêmeas inoculadas com *Klebsiella pneumoniae*

Os primeiros ensaios realizados com fêmeas e administração de antibiótico após a inoculação intratraqueal de 6×10^8 UFC de *K. pneumoniae* mostraram que a sobrevivência do grupo subiu para 60% (figura 4.6a), frente os 30% que dos machos (figura 4.1). Além disso, a média do escore clínico das fêmeas foi mais alta ao ser classificada como sepse moderada (figura 4.6b) e, quando aferimos se os animais estavam em choque séptico através da temperatura (figura 4.6c), havia uma grande diferença na temperatura entre os animais controle e infectados.

Após a realização de dosagem de proteína para aferição de alteração nos níveis normais de moléculas sinápticas e pró-inflamatórias como MAPK em 24 h averiguamos que os níveis de p38 assim como PSD95 estavam alterados, estes sendo mais expressos que nos animais sadios em 24 h (figura 4.7).

Ao analisarmos o desempenho das fêmeas já recuperadas da sepse nos ensaios cognitivos através do labirinto aquático de Morris, foi possível observar que as fêmeas apresentavam comprometimento na memória espacial (figura 4.8).

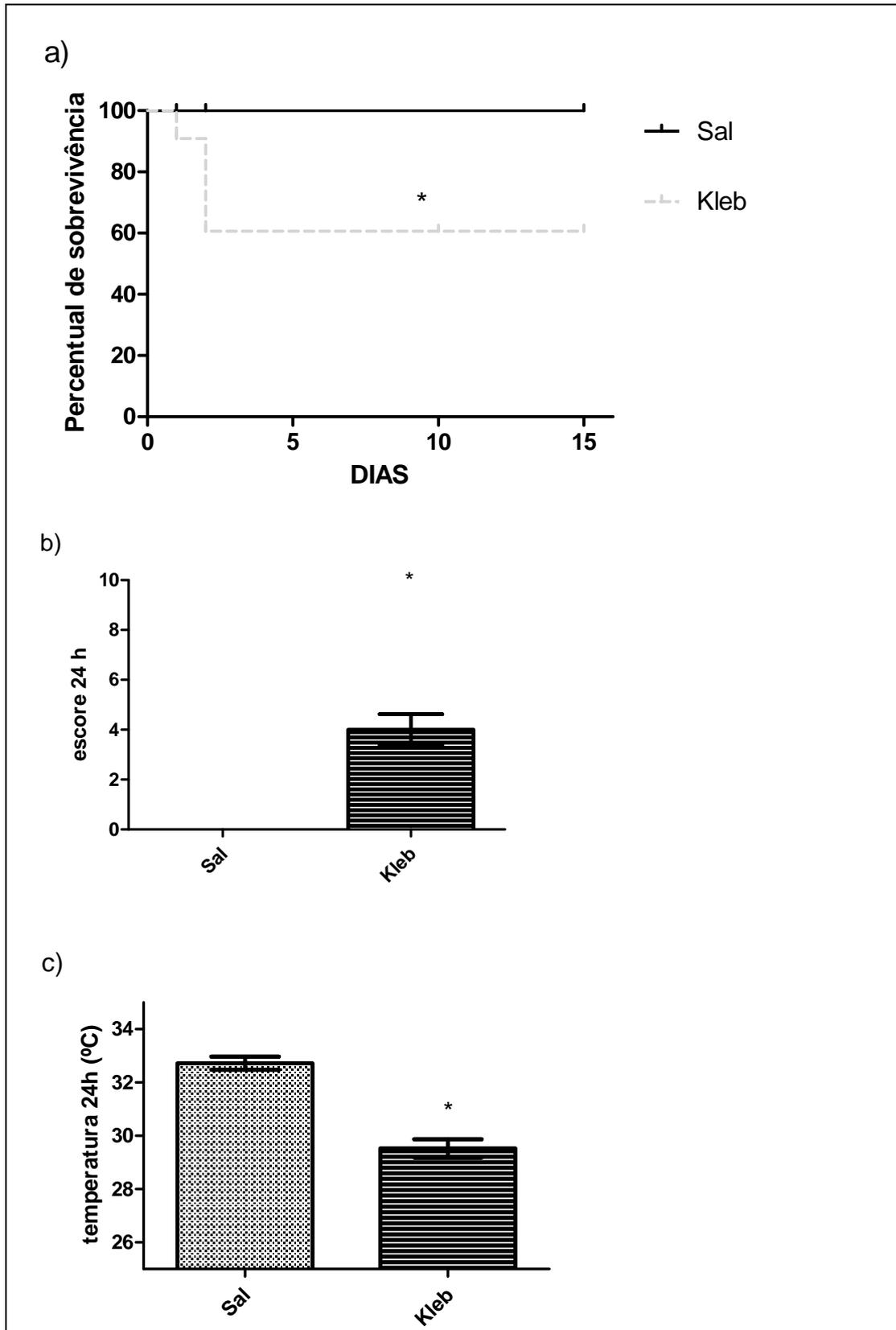


Figura 4.6. Fêmeas desafiadas com *K. pneumoniae* e tratadas com antibiótico apresentaram maior sobrevivência e severidade maior na sepse desenvolvida. (a) Sobrevivência das fêmeas infectadas com *K. pneumoniae* (b) escore clínico desenvolvido pelas fêmeas infectadas 24 h pós-

inoculação (c) temperatura das fêmeas 24 h após infecção. (*) $p \leq 0,05$; n dos grupos: 20 e 30, Sal, Salina; Kleb, *K. pneumoniae* e Salina.

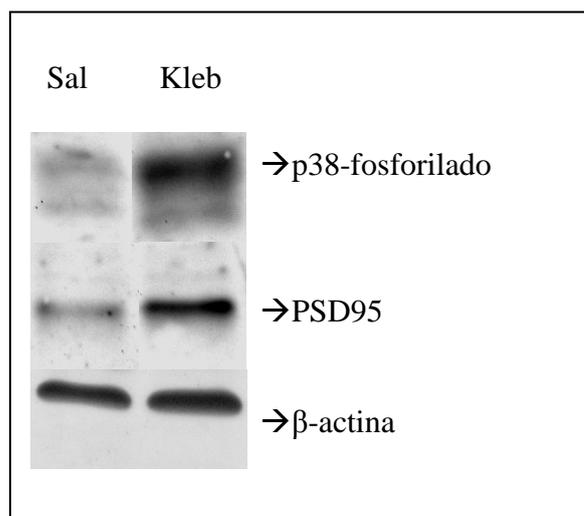


Figura 4.7. Análise da expressão de p38-fosforilado, PSD95 e β -actina em hipocampus das fêmeas. Grupos Salina (à esquerda da figura) e infectado com *K. pneumoniae* (à direita) em 24 h (imagem representativa. Número de indivíduos dos grupos 3).

4.5. O efeito do tratamento com rosiglitazona sobre quadro de choque séptico

As fêmeas foram tratadas com rosiglitazona e antibiótico para avaliação da sobrevivência, gravidade da sepse e variação da temperatura. Podemos observar que apesar da rosiglitazona não aumentar a sobrevivência do grupo infectado (figura 4.9a) nem prevenir a nível global o agravamento da gravidade da sepse desenvolvida pelas fêmeas (figura 4.9b). No entanto, ao analisarmos a queda de temperatura (figura 4.9c) desenvolvida pelos animais é possível verificar que houve uma menor diminuição ao compararmos os grupos infectados que não receberam rosiglitazona com os que receberam.

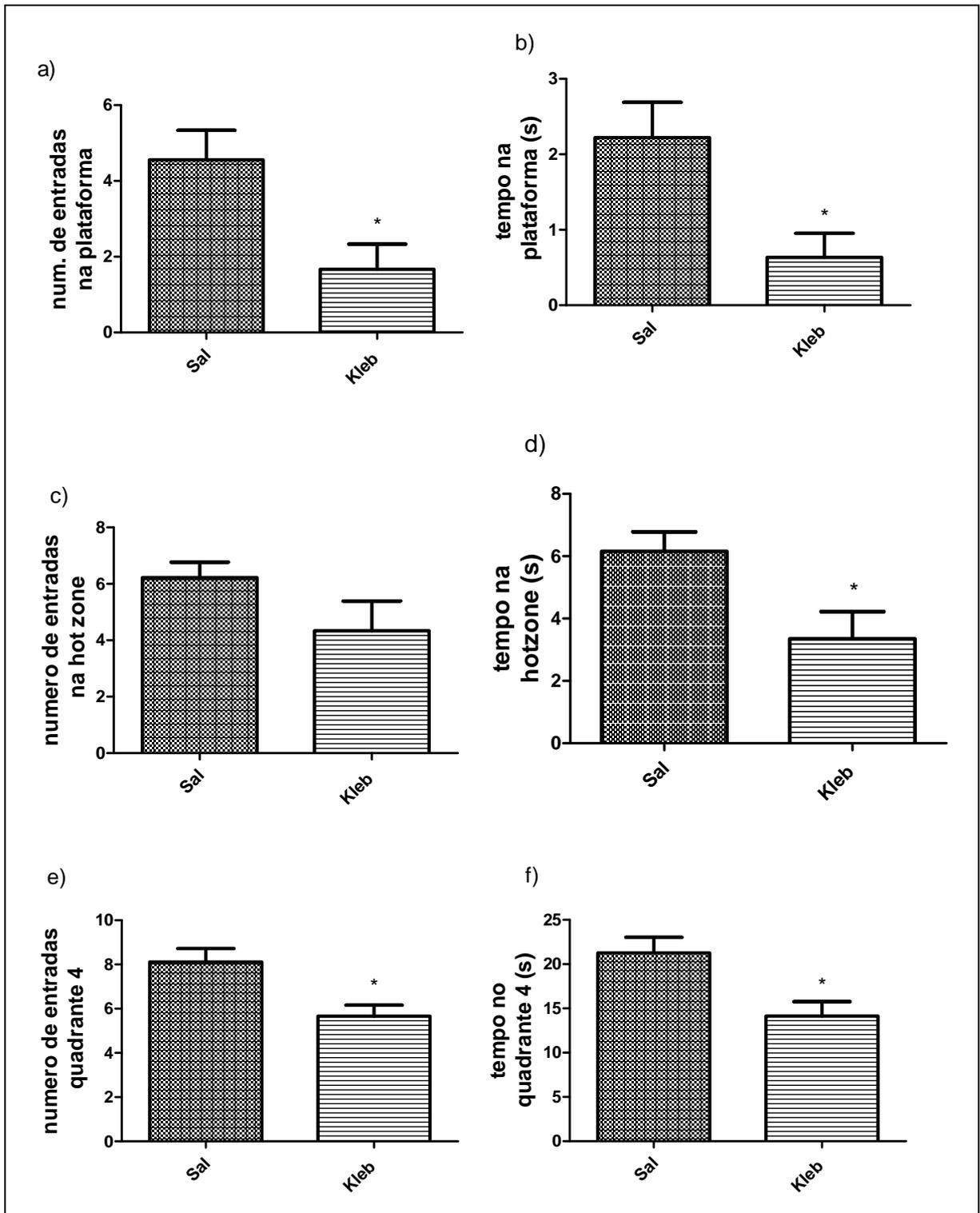


Figura 4.8. Camundongos fêmeas infectados com *K. pneumoniae* tratadas apenas com antibiótico (meropenem) durante a sepse desenvolvem disfunções cognitivas (a), (c) e (e) Gráficos que mostram o número de vezes em que os camundongos entraram nas áreas da: plataforma, “hot zone” e no quadrante da plataforma, respectivamente. Em (b), (d) e (f) tempo que os animais ficaram nas áreas da: plataforma, “hot zone” e quadrante da plataforma, respectivamente. (*) teste-t $p < 0,05$. N dos grupos: n dos grupos: 6 e 10, Sal, Salina; Kleb, *K. pneumoniae* e Salina, respectivamente.

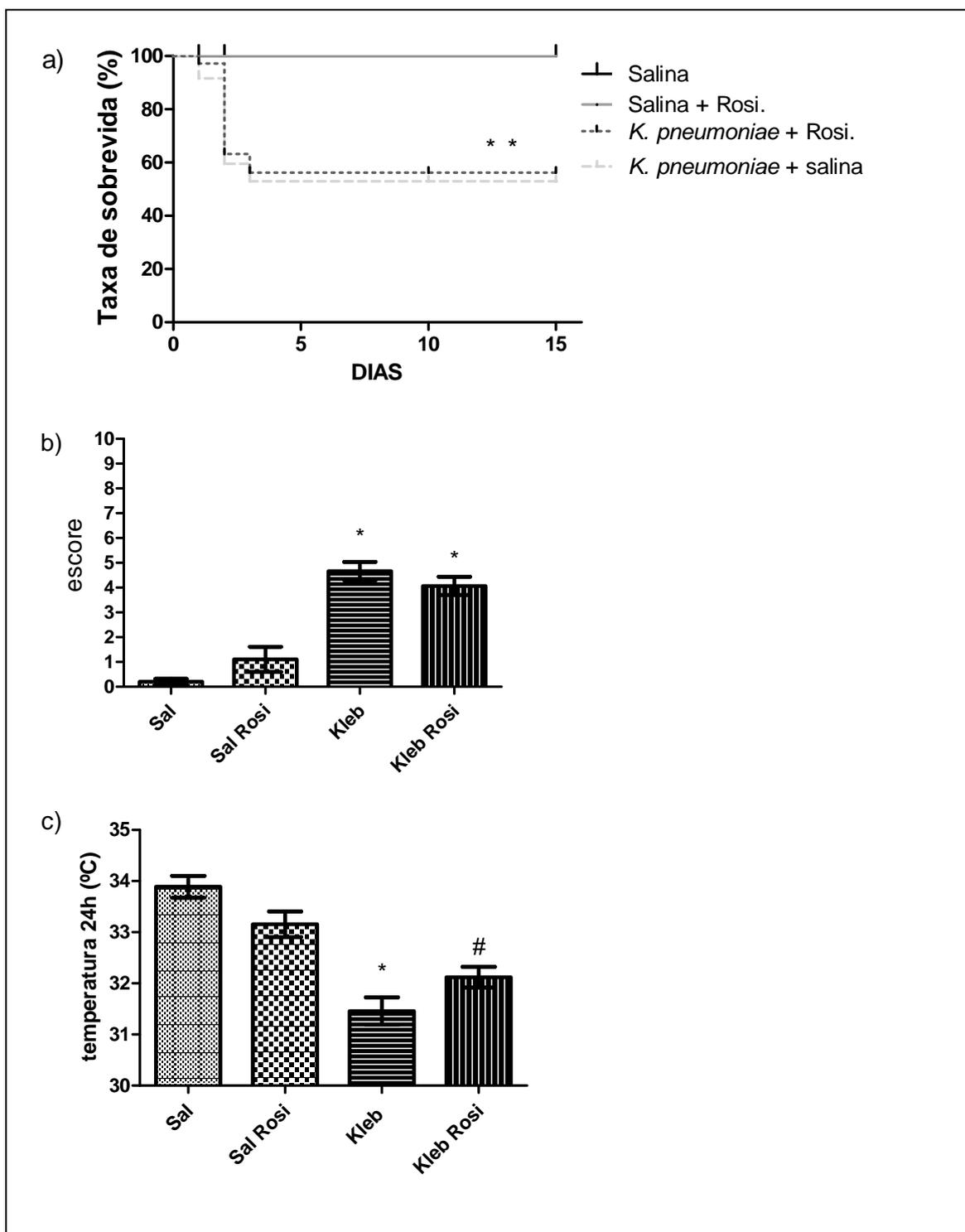


Figura 4.9. A rosiglitazona não alterou a sobrevivência nem a gravidade da doença porém preservou o agravamento do choque dos animais fêmeas infectados com *K. pneumoniae*. As fêmeas foram submetidas à instilação intratraqueal com 6×10^8 CFU de *K. pneumoniae* e foram tratadas com rosiglitazona (Rosi) 5 horas após o estímulo e 6 horas com antibiótico (meropenem). (a) A taxa de sobrevivência foi avaliada por sete dias e expressa por porcentagem. (b) Escore do aparecimento dos sinais clínicos foi avaliado 24 h após a infecção. (*) one-way ANOVA $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. (#) $p < 0,05$ em relação ao grupo Kleb.

4.6. O tratamento com rosiglitazona modula alterações em marcadores inflamatórios e sinápticos como visto nos animais infectados

Por meio das amostras de córtex e hipocampo das fêmeas foi possível avaliarmos os níveis de marcadores sinápticos. Os níveis de expressão de PSD95 (Figura 4.10), que desempenha funções fisiológicas no neurônio pós-sináptico estavam mais elevados nos infectados não tratados do que nos animais saudáveis ou infectados tratados com rosiglitazona. A sinaptofisina (Figura 4.10), molécula presente em vesículas no neurônio pré-sináptico, não sofreu qualquer alteração de seus níveis entre nenhum dos grupos estudados.

Nós observamos que a rosiglitazona inibiu a expressão da MAPK p38 fosforilada (Figura 4.11), já que os níveis deste estavam maiores nos hipocampos das fêmeas infectadas não tratadas com rosiglitazona em 24 horas após a infecção com *K. pneumoniae*. Os níveis de expressão da p38 fosforilada observado no grupo infectado tratado são comparáveis aos encontrados nos animais saudáveis.

Outros marcadores que não foram possíveis de se mensurar a diferença de expressão, por motivos de estarem abaixo dos níveis mínimos de detecção foram as citocinas IL-1B, IL-6, IL-10, TNF- α e espécies reativas de oxigênio tanto no córtex, quanto no hipocampo dos animais.

4.7. Avaliações funcionais tardias sugerem um caráter neuroprotetor da rosiglitazona quando os animais foram desafiados pela *K. pneumoniae*

Os animais após serem infectados com *K. pneumoniae* receberam a rosiglitazona em dose única, cinco horas após a instilação. A checagem da gravidade e acompanhamento da evolução da doença era feita durante os primeiros dias. Com 15 dias após a infecção os animais sobreviventes apresentavam escore clínico 0, e se iniciava o período de treinamento para que tivessem sua capacidade cognitiva testada no vigésimo dia após a infecção. Pelos dados obtidos com os experimentos do labirinto aquático de Morris (figura 4.12) observamos uma tendência a reversão do dano cognitivo dos animais infectados e tratados no desempenho dos testes. Pois o tempo, distância percorrida e número de vezes que exploraram a região que estaria a plataforma foi maior que os animais infectados que não receberam tratamento de rosiglitazona.

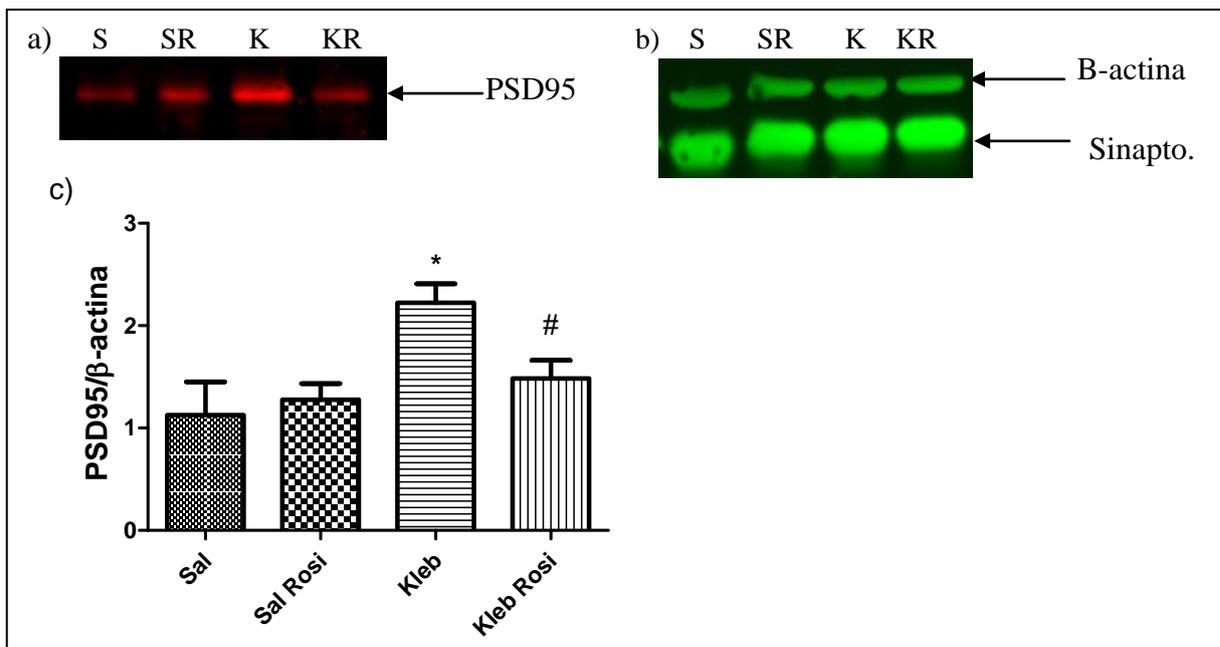


Figura 4.10. A rosigitazona inibe o aumento da expressão de PSD95 e não altera a expressão de sinaptofisina no hipocampo de fêmeas infectadas com *K. pneumoniae* Dosagem por “Western-Blotting” em hipocampo de fêmeas (a) PSD95. (b) B-actina e sinaptofisina. Ordem das amostras: Sal, Sal+Rosi, Kleb, Kleb+Rosigitazona. (c) Densitometria das amostras. S, Salina; SR, Salina e rosigitazona, K, *K. pneumoniae* e Salina; KR, *K. pneumoniae* e rosigitazona. (*) one-way ANOVA $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. (#) $p < 0,05$ em relação ao grupo Kleb (imagem representativa. Número de indivíduos nos grupos ≥ 3).

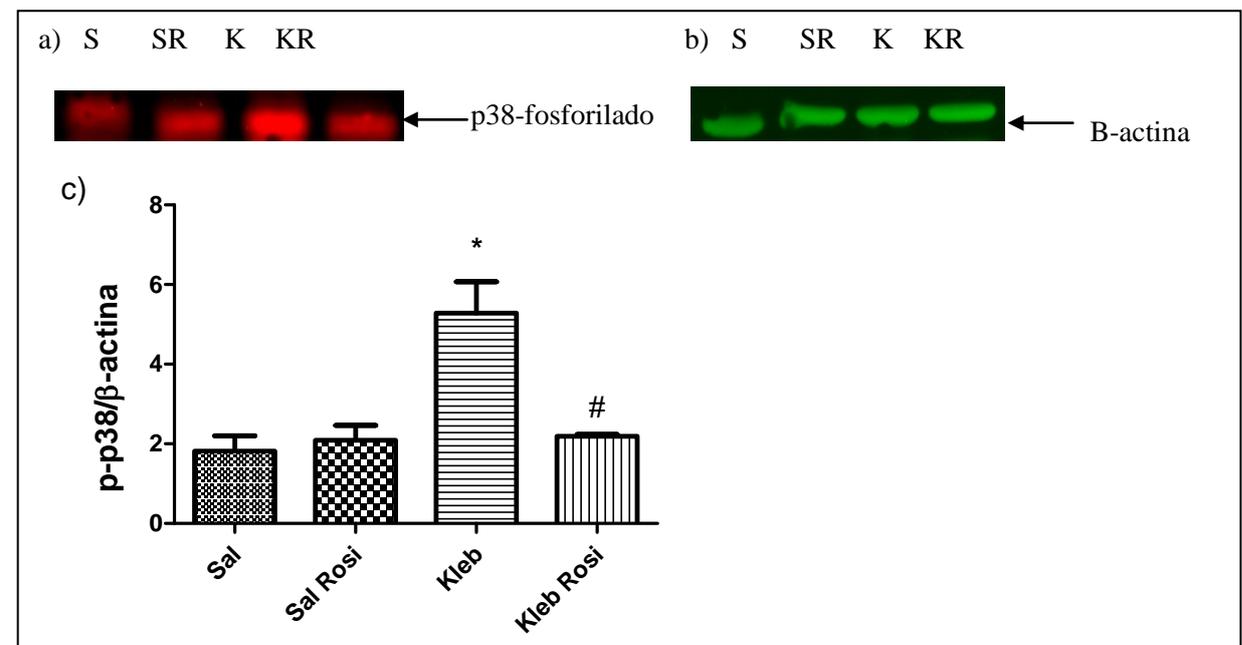


Figura 4.11. A rosigitazona inibe o aumento da fosforilação da MAPK P38 desempenhando um papel anti-inflamatório no hipocampo de fêmeas infectadas com *K. pneumoniae* Dosagem por “Western-Blotting” em hipocampo de fêmeas. (a) Em vermelho MAPK p38-fosforilado e em verde (b)

a marcação constitutiva: B-actina. Ordem das amostras: Sal, Sal+Rosi, Kleb, Kleb+Rosigitazona. (c) Densitometria das amostras. S, Salina; SR, Salina e rosigitazona, K, *K. pneumoniae* e Salina; KR, *K. pneumoniae* e rosigitazona. (*) one-way ANOVA $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. (#) $p < 0,05$ em relação ao grupo Kleb (imagem representativa. Número de indivíduos nos grupos ≥ 3).

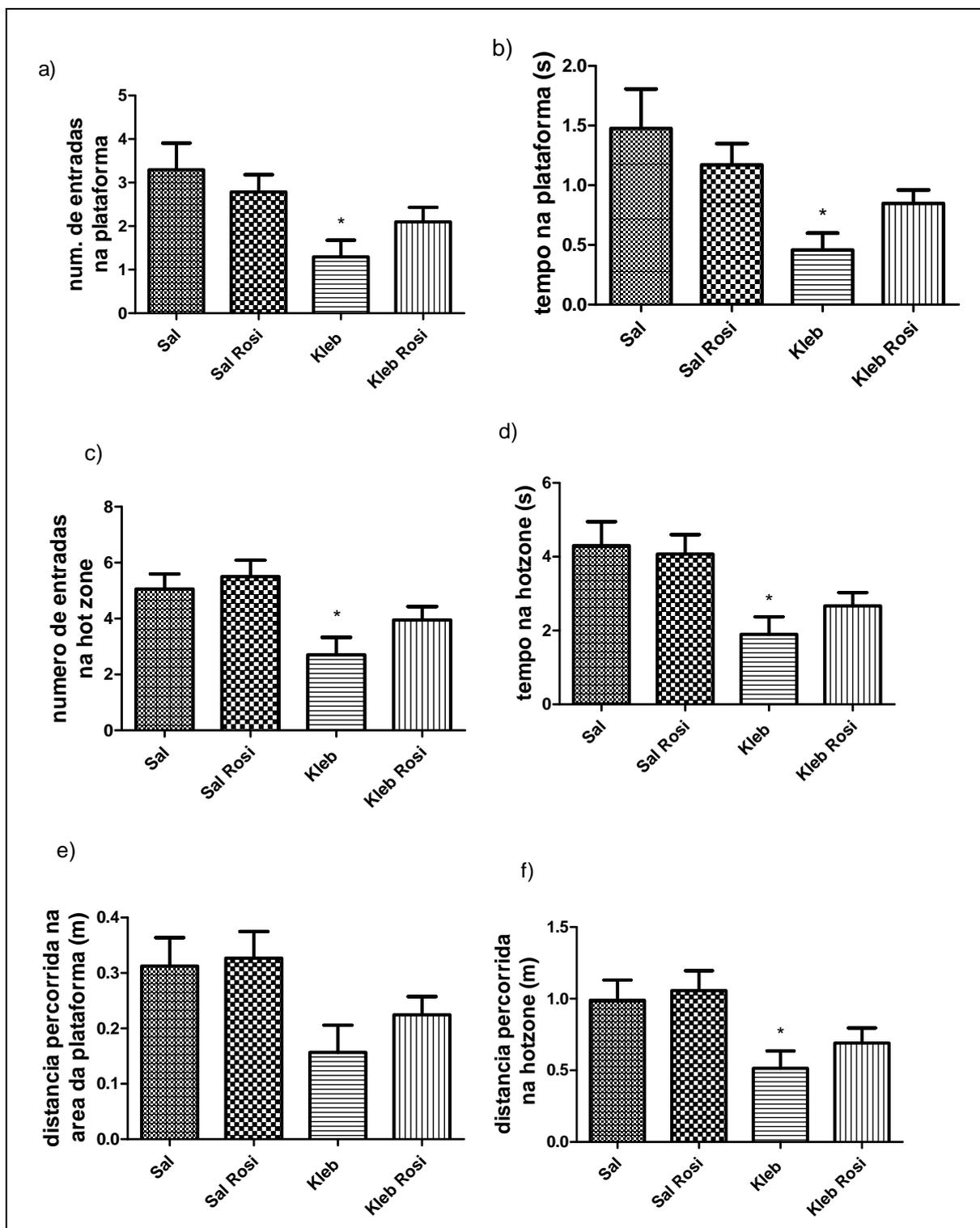


Figura 4.12. Avaliação funcional da neuroproteção advinda do tratamento com a Rosiglitazona. Labirinto aquático de Morris, teste de memória espacial. Os animais (fêmeas) já recuperados da infecção (15 dias após a inoculação) tinham sua capacidade de memorização avaliada.

Definições: Área da plataforma 13 cm² propriamente dita e *hot zone* é a área de 18 cm² com o centro coincidindo com o da suposta plataforma. (a)/(c) número de vezes que os grupos entraram na área da plataforma/*hot zone* (b)/(d) tempo que os grupos ficaram na plataforma/*hot zone* e (e)/(f) distancia percorrida na área da plataforma/*hot zone*. N dos grupos: 17; 14; 18; 21 Sal, Salina; Sal Rosi, Salina e rosigitazona, Kleb, *K. pneumoniae* e Salina; Kleb Rosi, *K. pneumoniae* e rosigitazona. (*) one-way ANOVA p<0,05 em relação ao grupo salina.

Sexo	Tratamento	Sobrevida	Escore clínico	Citocinas		Western-Blott			Memória	
				Pulmão	Cérebro	p38-fosfo	PSD95	sinaptofisina	aversiva	espacial
♂	xxxxxxxxxxx	30%	moderada	↑	=	=	=	=	=	=
	rosigitazona	70%	leve	↓*	=	=	=	=	-	-
♀	xxxxxxxxxxx	57%	moderada	-	-	↑	↑	=	-	↓
	rosigitazona	55%	moderada	-	-	=	=	=	-	*=

* tendência

= sem alteração

- não avaliado

↑ aumento

↓ diminuição

Tabela 4.1. Resumo dos resultados encontrados no desenvolvimento do trabalho. Os resultados foram divididos primeiramente em gênero em seguida por tratamento. Os parâmetros avaliados foram: sobrevida, escore clínico, citocinas (pulmão e cérebro), Western-Blott dos tecidos neurais dos animais e testes de memória. É digno de nota que os resultados aqui apresentados em machos não foi administrado antibiótico enquanto nas fêmeas sim.

5. Discussão

A sepse evoluída de pneumonia pela *Klebsiella pneumoniae* é uma das causas mais frequentes de sepse na clínica e, seus sobreviventes geralmente apresentam sequelas de ordem neurológicas podendo desaparecer ou ser mantidas pelo resto da vida. Há modelos de meningite, nos quais se instila intracranialmente ou no líquido cerebrospinal (CSF) bactérias como a *K. pneumoniae* ou LPS. Modelos experimentais de CLP, injeção ip. ou instilação intratraquel de LPS já demonstraram a encefalopatia séptica (49)

Porém, encontramos poucos relatos que utilizem o mesmo agente etiológico presente na clínica, em modelos experimentais de sepse evoluída de pneumonia, menos ainda trabalhos que façam uma abordagem terapêutica visando o dano cognitivo em sobreviventes de sepse. No nosso estudo, não só conseguimos observar que a infecção por *Klebsiella pneumoniae* promove acometimentos neurológicos deixando sequelas de ordem cognitiva em animais, fêmeas, sobreviventes recuperados.

A maioria dos artigos em modelos experimentais de endotoxemias e sepse se baseia na injeção intraperitoneal de LPS ou via CLP, no entanto, pouco é relatado sobre o desenvolvimento da pneumosepse. Desta forma, muitos trabalhos aqui referenciados e comparados são com esses modelos ao invés de trabalhos que abordem a pneumonia (50). O ensaio de CLP; consiste na exposição do ceco do animal *sham* e os CLP além da exposição sofrem perfuração e extravazamento de fezes para a cavidade abdominal. As curvas de sobrevivência são similares quando comparamos os dois modelos, pneumosepse e CLP, porém a gravidade do CLP é maior quando comparados os sinais clínicos (46). Os animais submetidos ao CLP apresentam neuroinflamação em 24 h e dano cognitivo após 10 dias (51). Não há um consenso em quantos furos devem ser feitos no modelo de CLP, nem a quantidade de fezes que induza a sepse, além de ser difícil mensurar o nível de aperto que o nó deve ser dado para que o modelo de sepse fique padronizado (52).

O nosso grupo mostrou que o uso de glitazonas reverteu as alterações na perfusão do tecido nos modelos de CLP (46). Como a evolução da pneumosepse é diferente da evolução da sepse de origem abdominal, as análises em outros tempos seriam necessárias para elucidar a cronologia dos eventos e refinar o modelo. Além disso, durante a indução do CLP os animais são anestesiados via intraperitoneal com ketamina e xilasina. Existe uma divergência na literatura quanto os efeitos desses anestésicos no SNC, se são neurotóxicos ou protetores, a falta de um consenso é vista tanto no tempo de exposição quanto na dose administrada (53).

Os modelos de injeção de LPS, seja intraperitoneal ou intratraqueal, não mimetizam a real situação que acontece em humanos. Ao se injetar bactérias no animal ou qualquer outro

patógeno, se aproxima mais da realidade, pois com a morte do patógeno, há a liberação de formas variadas de toxinas, além da morte celular causada por eles e liberação de DNA no meio extracelular tornando o quadro bem mais complexo do que apenas a resposta do organismo a um componente bacteriano (49).

Além do CPS e LPS outras moléculas produzidas pela *K. pneumoniae* já foram descritas quanto a sua função no processo inflamatório ou injúria ao hospedeiro. O antígeno-O impede o acesso de componentes do sistema complemento a se ligarem a porinas ou ao LPS, além de facilitar a adesão a células epiteliais do hospedeiro. O lipídeo-A, ancorado na membrana é fator de resistência a fagocitose por macrófagos. As adesinas que auxiliam a colonização do patógeno a diversos sítios no organismo.

Outras proteínas como a OmpA, presente na membrana externa impedem a ativação de vias inflamatórias como a via do NF- κ B no epitélio pulmonar por interferir na via das MAPK p38 e p42/44. Diversos tipos de sideróforos, moléculas captadoras de ferro, do hospedeiro. Essas entre outras desenham a complexidade que o sistema imune deve encarar para se livrar desse patógeno (13).

Após ajuste da carga bacteriana a ser injetada nos animais o modelo de pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* instilada intratraquealmente induziu dano cognitivo nos sobreviventes da sepse, mesmo fenômeno observado na clínica. No primeiro momento do trabalho realizado, os machos foram o objeto de estudo, e durante esta fase os animais não recebiam antibiótico ou qualquer tipo de tratamento além da rosigitazona. Ainda assim, a sobrevida dos animais infectados tratados com a rosigitazona foi superior ao grupo não tratado. Depois de se aumentar a carga bacteriana e se introduzir o meropenem no estudo, não houve diferença na sobrevida dos animais entre o grupo de machos tratados com rosigitazona e meropenem ou somente tratado com a rosigitazona (dados de estudos prévios do laboratório).

Estudos sobre as diferenças entre a resposta a diversos patógenos em machos e fêmeas revelam que os machos geralmente são mais suscetíveis a ação de agentes infecciosos, enquanto as fêmeas são mais resistentes a infecções virais, parasitas e bactérias. Na sepse, a incidência de sepse em mulheres é menor que em homens e há divergências quanto as taxas de sobrevivência ligada ao gênero (54) (12) (55). Apesar de não se saber precisamente o motivo dessa resistência ou suscetibilidade a patógenos, algumas sugestões são feitas como a da resposta imune ser mais bem estruturada em fêmeas (50). Em experimentos de monócitos humanos do sexo masculino estimulados com LPS houve uma maior secreção de citocinas do que as do sexo feminino, o que pode ser considerado como um mecanismo que os torna mais suscetíveis a sepse do que em mulheres. A expressão de diferentes tipos de TLR foram

comparadas em macrófagos isolados de peritônio isoladas de camundongos de ambos os sexos e os tipos 2; 3 e 4 foram encontrados em maior quantidade de fêmeas que em machos, o que leva a crer que há mais fagocitose e morte bacteriana nesse gênero. Outros fatores como os níveis de estrogênio principalmente, além de outros hormônios atuarem diretamente na proliferação de células imune, produção e secreção de citocinas, sua presença está intimamente conectada com a resposta imune armada. Por fim, fatores genéticos como as diferenças entre os cromossomos X e Y, como ,por exemplo, o cromossomo X possuir mais genes imunossupressores que o Y (50).

Em experimentos prévios (dados não mostrados), ao testarmos a carga bacteriana de 5×10^8 em fêmeas não foi atingida as taxas de mortalidade encontradas nos estudos em modelos animais de sepse. Ao aumentarmos para 6×10^8 em ambos os grupos, as taxas de mortalidade foram próximas a 100% e mesmo com antibioticoterapia não foi possível resgatar os machos. A introdução da antibioticoterapia foi escolhida após os níveis de gravidade e mortalidade serem atingidos nos experimentos em fêmeas, por se assemelhar com o que acontece na clínica. A fragilidade apresentada por machos quanto à sobrevida descrita na literatura frente a infecções graves, também observado nesse estudo, Os machos que desenvolviam escore alto e provavelmente déficit cognitivo vinham a óbito. Este foi o motivo de irmos além e avaliarmos o que aconteceria se o mesmo modelo fosse aplicado a fêmeas para o estudo das sequelas neurológicas.

Como já exposto, em situações críticas na clínica; choque séptico, “community-acquired pneumonia”, meningite, lesões medulares, entre outros casos, existe divergência se o tratamento com corticosteroides deve ser realizado ou não no caso do choque séptico. Altas doses de corticosteroides para cumprir a função de imunorrepressão foram ineficazes e possivelmente prejudiciais. Doses baixas ao mesmo tempo em que revertiam o choque apresentaram taxas elevadas de reinfecção. Várias tentativas de terapias associadas como insulina foram em vão na tentativa de aumentar a sobrevida dos pacientes. Ainda assim, quando recomendada a terapia com corticoesteroides ela varia de quem deve ser indicado e a sua duração. Por esses e outros motivos não há convergência na literatura quanto a esse tipo de terapia. Desta forma existe a hipótese que a imunomodulação de alvos específicos seja mais eficaz que a imunomodulação por corticoesteroides (56).

O escore clínico proposto pelo nosso laboratório avalia de maneira não invasiva os modelos experimentais para aferir o quão doente o animal pode estar. O escore foi elaborado baseado no escore SHIRPA (“SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College and Royal London Hospital phenotype assessment”) de avaliação de fenótipos animais (57). Os nossos estudos com machos mostram que houve diferença na gravidade séptica (sepse moderada nos

animais que não receberam a rosiglitazona) como não foi possível observar nenhuma diferença molecular e cognitiva nestes indivíduos e cargas mais baixas não foram suficiente para que se atingisse a gravidade desejada para a realização do estudo, iniciou-se o estudo em fêmeas.

No grupo das fêmeas mesmo não se observando diferença na gravidade da sepse, ao se isolar o parâmetro de alteração de temperatura corpórea pode-se constatar alteração estatisticamente significativa nos coortes em 24 h. A maioria dos artigos ao mensurarem a temperatura dos animais o fazem por telemetria ou por sonda retal. Nós aferimos a temperatura externa dos animais através do termômetro infravermelho, o que pode explicar a diferença de aproximadamente 3°C entre a temperatura normal interna dos animais. A hipotermia apresentada é um sinal do quadro de choque séptico, causada pela hipotensão refratária, presente mesmo após a reposição volêmica; sintoma de caráter grave na sepse. Drechsler e cols. investigaram diversos marcadores de disfunção orgânica para prever qual seria o parâmetro mais importante para causar a morte nos modelos animais, após induzir sepse pelo modelo de CLP e temperaturas inferiores ou iguais a 28°C é fatal (58). Nossos animais não chegaram a apresentar temperaturas tão baixas mesmo quando viessem a óbito em até 24 h. A relação que precisa ser melhor elucidada é: Por quê os animais apresentavam hipotermia e pontuavam escore de sepse leve pelo nosso escore?

Há diferença entre a resposta inflamatória de machos e fêmeas em diversos aspectos, como celularidade, citocinas e ativação gênica. Os homens são mais suscetíveis a bacteremias que mulheres (50). Além disso, em um estudo comparando algumas espécies de camundongos, foi observado que a temperatura dos animais sobe nas primeiras 2 horas e nas seguintes caem consideravelmente e se reestabelecem em até 9 h, após a injeção de LPS extraído de *E.coli*. Essa alteração é atribuída ao choque endotóxico. Ao dosarem citocinas de amostras de sangue foi observado níveis mais altos de TNF- α 2 horas após a injeção de LPS, retornando aos valores basais em 7 h. A alteração de temperatura foi vista nesse tempo. Os níveis de IL-1B também atingiram seus picos em 2h, apesar de manterem elevados. Alguns estudos divergem quanto ao tempo do pico de IL-6, neste estudo foi visto o pico em 7 h, após a administração do LPS. A única citocina que apresentou diferença entre os animais de sexo diferente foi IL-6. Quanto à temperatura, os animais CD1 e C57Bl/6 machos apresentaram maior temperatura ao longo do tempo quando comparados as suas respectivas fêmeas (59). O mesmo padrão foi visto por outro grupo em machos, seguida pela queda de temperatura (60), onde o pico de febre se deu em 1h após a injeção de LPS.

O hipotálamo controla a termorregulação através da conservação de calor (pela vasoconstrição periférica) e a produção de calor pela secreção de tiroxina e epinefrina (61).

Alterações no SNC alteram esse mecanismo. A hipotermia pode afetar todos os sistemas, principalmente o cardiovascular e SNC, a despolarização das células marcapasso cardíacas causam a bradicardia. Quando a hipotermia é prolongada o metabolismo neural é diminuído de acordo com a queda da temperatura corporal. Em humanos, temperaturas abaixo de 33°C causam a queda da atividade elétrica padrão no cérebro (62).

A fisiopatologia da disfunção cerebral na sepse é multifatorial e um dos seus cenários principais é a quebra da BHE, levando a um quadro de morte celular. Os mecanismos de isquemia, estresse oxidativo e neuroinflamação também tem sua importância. O dano cognitivo é consequente destas condições nos sobreviventes sépticos. Ao destrinchar um pouco mais esses mecanismos vê-se que as células da glia secretam citocinas e quimiocinas que causam o desbalanceamento da homeostase neuronal. Como demonstrado em 2014 por Moraes e cols. a presença de IL-1 β é peça-chave para desencadear ativação desses tipos celulares (63) iniciando um efeito de “feedback” positivo onde a microglia ativada secreta mais IL-1 β , conseqüentemente leva a uma perda sináptica. Em nosso trabalho ao tentarmos avaliar os níveis de IL-1 β os valores aferidos foram baixos dentro da curva de detecção;

Tentativas de se caracterizar biomarcadores da encefalopatia séptica durante o curso da doença foram feitas em humanos. Os autores observaram níveis diminutos de IL-10 e “Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted” (RANTES) nos pacientes que apresentaram delírio com e sem SIRS. O BDNF é uma proteína neurotrófica, promovendo a sobrevivência neuronal e modulando a conectividade sináptica. Pacientes com encefalopatia séptica apresentaram níveis mais altos deste do que os pacientes com delírio ou apenas SIRS (64). Tomasi e cols. (2016) não chegaram a diferenciar se era pró-BDNF ou BDNF maduro, que poderia propiciar efeito anti- ou pró-sináptico respectivamente (64).

As células neurais quando injuriadas liberam glutamato, que ativam receptores metabotrópicos na microglia e, conseqüentemente, modificam seu perfil para um fenótipo neurotóxico (34, 63). O fenótipo neurotóxico libera radicais livres que darão início a vias de morte celular. Após a injeção de LPS em ratos foi visto aumento nos níveis de lipocalina-2 (LCN2) após a neurotoxicidade por cainato (aminoácido participante do aumento do influxo de cálcio). Já foi proposto que a lipocalina-2 é um sinalizador de suporte tecidual na inflamação, induzindo a remodelação tecidual. Quando a microglia é ativada via LCN2 ela libera mais IL-10, PSD95, BDNF e TSP-1, produz outras proteínas sinápticas além de exercer um papel protetor neuronal contra a privação de glicose e oxigênio (65). Portanto, a visão sobre o desempenho maléfico da microglia e astrócitos quando ativados deve ser revista uma vez que estas células apresentam funções benéficas ao tecido lesado. Dependendo do fenótipo apresentado, seja ele bastonete, tido como anti-inflamatório similar ao perfil M2 de

macrófagos ou M1 quando apresenta ramificações vistas após a injeção de LPS elas podem apresentar funções diferentes (65).

Outras proteínas são secretadas pelos neurônios como sinal de suporte tecidual e a LCN2 nem sempre exerce a mesma função. Em diversas patologias como após a exposição por período prolongado de LCN2 a morte celular pode estar aumentada, como visto em condições de estresse mediadas por concentrações altas de ferro (65). Em nosso trabalho foi visto um aumento de PSD95 no hipocampo dos animais injetados com *Klebsiella pneumoniae* que não receberam o tratamento com rosiglitazona. Mesmo comparados aos salinas estes níveis estão aumentados. Em modelos de infecções prolongadas como em malária ou AD as concentrações de PSD95 caem ao longo do tempo. Sabe-se que o PSD95 está associado ao NMDAR e que este receptor, dependendo de sua localização (extrassináptico ou sináptico) pode desempenhar diferentes funções (34), talvez exista algum sinal que aumente a expressão do NMDAR extrassináptico em nosso modelo.

Constam na literatura alguns estudos onde bactérias alteram a expressão do PPAR gama. *S. typhimurium* modula sua expressão no epitélio intestinal exacerbando a resposta inflamatória. Ao mesmo tempo, a expressão do LCN-2 é regulada pela via do AP-1 e NFκB. Portanto, a partir destas informações é possível explicar o aumento na expressão de PSD95 nos hipocampos dos animais. Uma vez que a ativação do PPAR gama inibe a via do AP-1 e NFκB. Também é válida a extrapolação da regulação da ativação/expressão do receptor nuclear pela LCN-2 e pela presença bacteriana como vista em casos de colite (66) (67, 68).

As alterações no microambiente tecidual ativam as subfamílias das MAPK. A ativação da p38 através da fosforilação desencadeará uma série de ativações de proteínas, estejam estas no citoplasma ou no núcleo. Este mecanismo de sinalização pode acontecer em eventos fisiológicos ou patológicos.

O p38 foi primeiramente identificado no processo inflamatório participando da síntese de mediadores inflamatórios como IL-1β e TNF-α, outros fatores como COX-2, IL-8, IL-6 e IFN-γ. O p38 também possui implicações no sistema cardiovascular, pois é ativado durante a isquemia e hipóxia /reperfusão tecidual. Quando inibido há diminuição na indução de vias de necrose e apoptose devido à acidose intracelular. Alguns estudos concluem que a ativação do P38 induz vias apoptóticas outros a necrose. Em modelos de Alzheimer, por ser uma doença estéril não existe a ativação da via por TLR4, entretanto, o acúmulo e formação de placas extracelulares e emaranhados de filamentos de proteína β-amiloide induzem a ativação da glia e a secreção de citocinas que ativam a via da p38. É proposto também que a JNK e p38 hiperfosforilem a proteína Tau, característica chave no processo neurodegenerativo desta e outras doenças. Em modelos de isquemia, a morte neuronal mostra-se como um processo

transcrição-dependente que necessita da expressão de sinais de morte gênicos assim como a repressão de sinais de sobrevivência. A inibição das vias MAPK tem um efeito neuroprotetor durante o momento de injúria neuronal. Com exceção da ERK, as vias das MAPK são ativadas em momentos de estresse celulares que traduzem esse momento em resposta transcrição-dependente. O estresse celular é geralmente acompanhado da diminuição da fosforilação e ativação de ERK, e a apoptose é mediada por seu sinal. Em contrapartida, a apoptose é dependente da ativação de p38 e JNK, que de maneira sucessora ativarão ou inibirão a CREB, determinando a sobrevivência do neurônio (34).

A reversão do dano comportamental em modelos de AD, apesar de não se saber precisamente os mecanismos, foi observado após o uso da pioglitazona (uma TZD). Pela característica inibitória da via das MAPK estipula-se que seja através dessa e outras que exista essa reversão (69).

Por mais que o PPAR gama desempenhe um papel imunossupressor em vários modelos, neste estudo, nas doses e tempos de análises realizados, não foi observado nenhum efeito biológico após a administração desta substância. Talvez não seja o fármaco nem o alvo, mas sim as doses. Doses únicas de rosiglitazona podem desenvolver um efeito neuroprotetor, por isso vê-se tendência estatística em alguns dos resultados, porém este efeito só é benéfico para os animais que conseguem resolver a sepse no período de 24 h, já que a meia-vida deste fármaco é de 3-4 h (67).

Nas últimas caracterizações de AD, sugere-se que se trate de uma espécie de diabetes no SNC, por isso muitos estudos tem dado atenção à terapia com glitazonas para a doença. Já foi observado que, em modelos experimentais de AD os animais tratados tinham memória aversiva preservada, aumento da plasticidade hipocampal, redução da hiperfosforilação de Tau e da proteína amiloide, além da redução de citocinas pró-inflamatórias. Por microarranjo a pioglitazona foi relacionada às vias glutamatérgicas, ao modular genes associados aos transportadores de glutamato (Slc1 e Slc1a2), receptor metabotrópico de glutamato 3, AMPAr2(Gria2), a subunidade delta-2 do receptor de glutamato e a subunidade zeta-1 do receptor NMDA (15). A pioglitazona é uma agonista seletivo de PPAR, talvez a utilização da rosiglitazona resultaria em uma maior neuroproteção por ser um agonista mais eficaz do PPAR (38).

Sattler e colaboradores ao fazerem supressão do PSD95 obtiveram um efeito preventivo na excitotoxicidade nos NMDAR (70). Em outro estudo foi demonstrada a interação entre NMDAR-PSD95-nNOS aumentada em isquemia cerebral. Esse dado pode explicar um pouco o desenvolvimento da neurotoxicidade com o NMDAR e PSD95 (71).

O sítio de ligação PDZ2 do PSD95 se liga a nNOS e a proximidade com o NMDAR causa com o influxo de cálcio a ativação do nNOS. Esse estresse vai desencadear a morte neuronal via metaloprotease-9. Outra cascata que pode ser ativada é pelo gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH) necessário para a interação com Siah1 que promoverá a translocação nuclear do GAPDH, essencial para a excitotoxicidade neuronal. (34).

Quanto à morte neuronal no hipocampo em modelos de CLP é observada que a via da apoptose está ativada a partir de 12 h após o procedimento. A anestesia utilizada nesse modelo de 7-furos pode estar associada ao fenômeno observado. De qualquer forma, em tempos maiores (24, 48 h e 10 dias após o procedimento) viu-se que havia apoptose e caspase-3 ativada. Ainda que diminuísse ao longo do tempo, com 10 dias havia uma tendência das vias continuarem ativas (72). Matsuoka e colaboradores ao administrarem o LPS associaram o processo com excesso da produção de óxido nítrico, que parece ter associação com a via de morte por intermédio da JNK e morte por necrose. Enquanto em outro trabalho (73) é mostrada a atividade da caspase-1, que acarreta na morte por apoptose. Em conjunto, esses dados sugerem que durante a sepse vários fatores causam a neuroinflamação através de diversos mecanismos de morte celular.

Schwalm e cols., em 2014, observaram que em ratos sobreviventes a sepse (do modelo de peritonite – CLP), após 30 dias há depósito de proteína β -amiloide no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais, além da redução da sinaptofisina reduzida nestas regiões (74). No nosso trabalho não observamos alteração nos níveis de sinaptofisina no hipocampo em 24h, enquanto a doença ainda está em curso. Ou seja, os níveis preservados de sinaptofisina e os de PSD95 elevados corroboram com o proposto que o assentamento do acometimento comportamental/cognitivo dê-se em um momento tardio do agravamento da condição clínica.

Portanto, com esse trabalho não só foi possível observar o acometimento na memória espacial em modelos animais de sepse induzida por pneumonia causada por *Klebsiella pneumoniae*, como foi possível estabelecer um modelo de estudo por meio da inoculação intratraqueal da *K. pneumoniae*. O escore montado pelo nosso grupo para se estratificar a gravidade da doença foi válido, no entanto não prediz o acometimento neurológico. A aferição da temperatura por infravermelho serviu para ver a distribuição do choque séptico nos animais. Por esses critérios foi possível ver que os animais se encontravam saudáveis durante os testes cognitivos. Da mesma forma, foi possível constatar o acometimento da memória espacial nas fêmeas recuperadas da sepse. Quando tratados com a rosiglitazona é notória a preservação quanto ao choque tanto em machos quanto em fêmeas e há uma tendência a neuroproteção disparada pela ativação do PPAR-gama. Quando este se encontra ativo, inibe a fosforilação da MAPK p38, suprimindo assim a morte neuronal por conta da

excitotoxicidade em animais não tratados. Assim, nossa hipótese é que não há apenas a perda de sinapses, porém suspeitamos que exista também a perda de neurônios.

Para finalizar, sugerimos a figura 5.1 como esquema didático dos eventos moleculares que acontecem em nosso modelo.

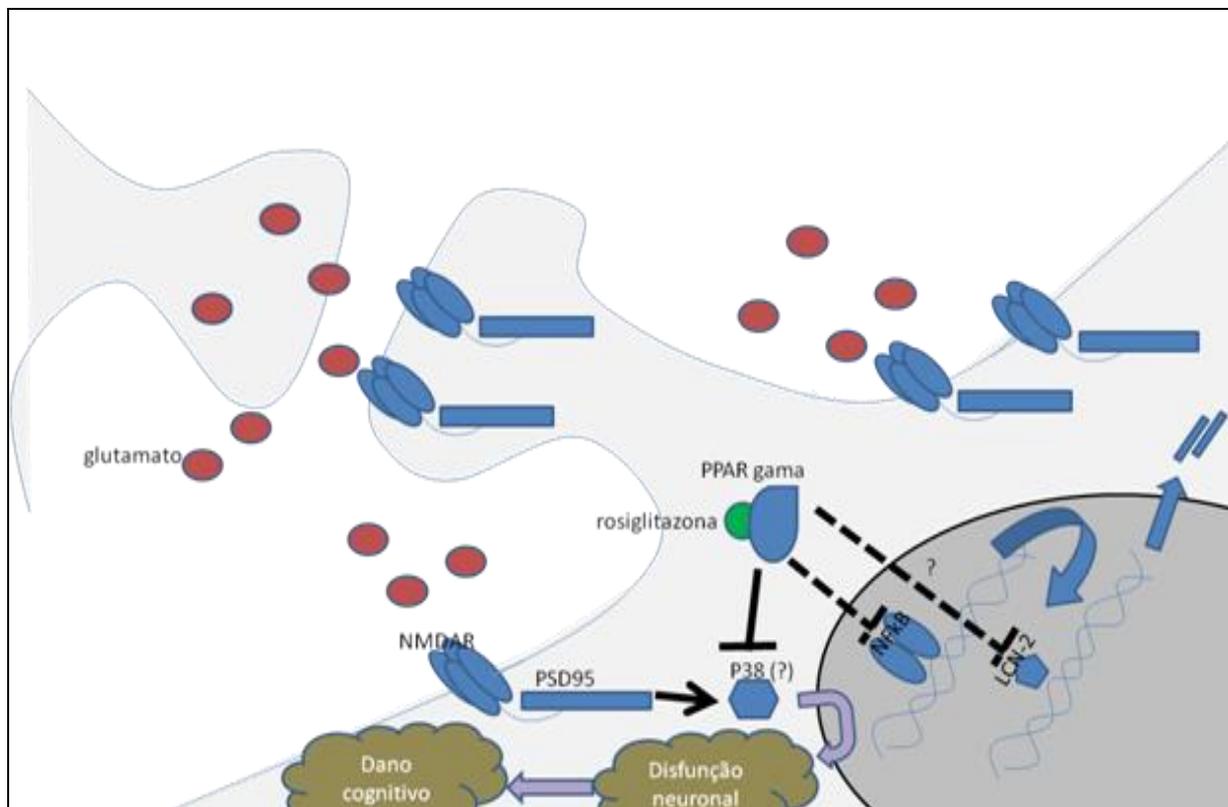


Figura 5.1: Encefalopatia durante a sepse desencadeada pela pneumonia. A pneumosepse originada pela *K. pneumoniae* causa encefalopatia por excitotoxicidade ocasionada pelo aumento do p38 ativado e dos níveis de PSD95. Todos esses acontecimentos levam ao dano cognitivo após a recuperação da sepse. Quando o PPAR-gama está ativado, este inibe a fosforilação do p38, assim como pode suprimir a via do NFκB. Portanto, sugerimos que pelo fato do NFκB transcrever a LCN-2 e esta por sua vez transcrever o PSD95, seja através dessa via que o PPAR gama ativo reprima a transcrição de PSD95.

6. Conclusões

O modelo de indução de dano cognitivo via instilação intratraqueal da *Klebsiella pneumoniae* alcançou os resultados esperados.

Quando associada à antibioticoterapia a rosiglitazona não causou aumento na taxa de sobrevivência dos animais por seu efeito além do atingido pelo grupo que só recebem antibióticos além de uma carga bacteriana maior comparado aos animais que apesar de uma dose menor de bactéria não receberam tratamento antibiótico. Embora, quando administrada unicamente protegeu esses animais mesmo sem o uso de antibióticos.

O tratamento reduziu a gravidade da doença em machos, enquanto em fêmeas não houve diferença na gravidade, apesar de impedir uma queda maior da temperatura dos mesmos.

Foi possível observar uma diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no sítio inicial da infecção.

A rosiglitazona aparenta ter um caráter neuroprotetor, pelo fato de existir uma tendência relacionada à inibição do dano cognitivo observado em animais que sobreviveram à infecção.

A infecção com *Klebsiella pneumoniae* causou um aumento na expressão de PSD95 e p38 fosforilado no hipocampo, podendo estar associada ao quadro de excitotoxicidade e aos resultados de disfunção cognitivos, estes podem ser alvos da inibição da rosiglitazona.

A rosiglitazona aparenta desempenhar um caráter neuroprotetor em dose única no início do processo infeccioso.

7. Referências

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *Jama*. 2016;315(8):801-10.
2. Bone RC BR, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992;101(6):1644-55.
3. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. *Critical Care Medicine*. 2013;41(2):580-637.
4. Duggal NCAK. Sepsis Associated Encephalopathy. *Advances in Medicine*. 2014;2014:16.
5. Sepse ILAd. COSTS – Estudo multicêntrico, prospectivo, randomizado para avaliação do custo de pacientes sépticos em unidades de terapia intensiva brasileiras. Rio de Janeiro 2016 [cited 2016 12 de maio de 2016]. Available from: <http://www.ilas.org.br/pg.php?v=costs>.
6. Sepse ILAS. SPREAD - Sepsis Prevalence Assessment Database [web]. 2016 [updated 2016; cited 2016 12 de maio de 2016]. Available from: <http://www.ilas.org.br/pg.php?v=spread>.
7. Vincent J, Rello J, Marshall J, et al. INternational study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama*. 2009;302(21):2323-9.
8. Wang J-Y, Chen Y-X, Guo S-B, Mei X, Yang P. Predictive performance of quick Sepsis-related Organ Failure Assessment for mortality and intensive care unit admission in patients with infection at the ED. *The American Journal of Emergency Medicine*. 2016.
9. Kaukonen K-M, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(17):1629-38.
10. Angus DC1 L-ZW, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;7:1303-10.
11. Mayr FB, Yende S, Linde-Zwirble WT, et al. Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *Jama*. 2010;303(24):2495-503.

12. Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(9):840-51.
13. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*. 2014;9(9):1071-81.
14. Sena-Vélez M, Redondo C, Graham JH, Cubero J. Presence of Extracellular DNA during Biofilm Formation by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Strains with Different Host Range. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156695.
15. Searcy JL, Phelps JT, Pancani T, Kadish I, Popovic J, Anderson KL, et al. Long-Term Pioglitazone Treatment Improves Learning and Attenuates Pathological Markers in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012;30(4):943-61.
16. Cortés G, Álvarez D, Saus C, Albert-Sn. Role of Lung Epithelial Cells in Defense against *Klebsiella pneumoniae* Pneumonia. *Infection and Immunity*. 2002;70(3):1075-80.
17. Michels M, Lucinéia Gainski Danieslki B, Andriele Vieira M, Drielly Florentino B, Dhébora Dall'Igna M, Letícia Galant B, et al. CD40-CD40 ligand pathway is a major component of acute neuroinflammation and contributes to long-term cognitive dysfunction after sepsis. *Molecular Medicine*. 2015.
18. Chen L, Zhang Z, Barletta KE, Burdick MD, Mehrad B. Heterogeneity of lung mononuclear phagocytes during pneumonia: contribution of chemokine receptors. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2013;305(10):L702-L11.
19. Berube BJ, Rangel SM, Hauser AR. *Pseudomonas aeruginosa*: breaking down barriers. *Current Genetics*. 2015;62(1):109-13.
20. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(1):9-20.
21. Garrabou G, Moren C, Lopez S, Tobias E, Cardellach F, Miro O, et al. The effects of sepsis on mitochondria. *J Infect Dis*. 2005.
22. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *Jama*. 2010;304(16):1787-94.
23. Levi M vdPT. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*. 2010;38:s26-34.
24. Perry VH, Cunningham C, Holmes C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):161-7.
25. Theresa Götz AG, Otto W Witte, Frank M Brunkhorst, Gundula Seidel, Farsin Hamzei. Long-term sequelae of severe sepsis: cognitive impairment and structural brain alterations – an MRI study (LossCog MRI). *BMC Neurology*. 2014;14(145).

26. Bozza FA, D Avila JC, Ritter C, Sonnevile R, Sharshar T, Dal-Pizzol F. Bioenergetics, Mitochondrial Dysfunction, and Oxidative Stress in the Pathophysiology of Septic Encephalopathy. *Shock*. 2013;39:10-6.
27. Kim K, Lee S-G, Kegelman TP, Su Z-Z, Das SK, Dash R, et al. Role of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT2) and Glutamate in Neurodegeneration: Opportunities for Developing Novel Therapeutics. *Journal of Cellular Physiology*. 2011;226(10):2484-93.
28. Paula TT, Dinesh M, Rafael T, Kim K, John N, Nita J. Validation of the Delirium Rating Scale-Revised-98. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 2001;13(2):229-42.
29. Semmler A, Widmann CN, Okulla T, Urbach H, Kaiser M, Widman G, et al. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2012;84(1):62-9.
30. Hooper PL, Durham HD, Torok Z, Hooper PL, Crul T, Vigh L. The central role of heat shock factor 1 in synaptic fidelity and memory consolidation. *Cell Stress and Chaperones*. 2016:1-9.
31. Broadhead MJ, Horrocks MH, Zhu F, Muresan L, Benavides-Piccione R, DeFelipe J, et al. PSD95 nanoclusters are postsynaptic building blocks in hippocampus circuits. *Scientific Reports*. 2016;6:24626.
32. Schmitz F, Pierozan P, Rodrigues AF, Biasibetti H, Grunevald M, Pettenuzzo LF, et al. Methylphenidate Causes Behavioral Impairments and Neuron and Astrocyte Loss in the Hippocampus of Juvenile Rats. *Molecular Neurobiology*. 2016:1-16.
33. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110.
34. Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*. 2014;115:157-88.
35. Annane D, Sibille V, Charpentier C, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *Jama*. 2002;288(7):862-71.
36. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, et al. Hydrocortisone Therapy for Patients with Septic Shock. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(2):111-24.
37. Zumla A, Rao M, Wallis RS, Kaufmann SHE, Rustomjee R, Mwaba P, et al. Host-directed therapies for infectious diseases: current status, recent progress, and future prospects. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(4):e47-e63.

38. Sauer S. Ligands for the Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015;36(10):688-704.
39. Tavares V, Hirata MH, Hirata RDC. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Pparg): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2007;51:526-33.
40. Woodcock J, Sharfstein JM, Hamburg M. Regulatory Action on Rosiglitazone by the U.S. Food and Drug Administration. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(16):1489-91.
41. Mitka M. FDA eases restrictions on the glucose-lowering drug rosiglitazone. *Jama*. 2013;310(24):2604-.
42. Chawla A. Control of Macrophage Activation and Function by PPARs. *Circulation Research*. 2010;106(10):1559-69.
43. Kulkarni AA, Woeller CF, Thatcher TH, Ramon S, Phipps RP, Sime PJ. Emerging PPARgamma-Independent Role of PPARgamma Ligands in Lung Diseases. *PPAR Research*. 2012;2012:705352.
44. Ferreira AE, Sisti F, Sanego F, Wang S, Filgueiras L, Brandt S, et al. PPAR-gama/IL-10 axis inhibits MyD88 expression and ameliorates murine polymicrobial sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2014;192(5):2357-65.
45. Araújo CVC, Clarissa; Gonçalves-de-Albuquerque, Cassiano F.; Molinaro, Raphael; Cody, Mark J.; Yost, Christian C.; Bozza, Patricia T.; Zimmerman, Guy A.; Weyrich, Andrew S.; Castro-Faria-Neto, Hugo C.; Silva, Adriana R. A PPAR γ agonist enhances bacterial clearance through neutrophil extracellular trap formation and improves survival in sepsis. *Shock Society*. 2016;Volume 45 (- Issue 4 -):10.
46. Araújo CV, Estato V, Tibiriçá E, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, Silva AR. PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. *Microvascular Research*. 2012;84(2):218-21.
47. Prakash A, Kumar A. Role of Nuclear Receptor on Regulation of BDNF and Neuroinflammation in Hippocampus of B-Amyloid Animal Model of Alzheimer's Disease. *Neurotoxicity Research*. 2013;25(4):335-47.
48. Drosatos K, Khan RS, Trent CM, Jiang H, Son N-H, Blaner WS, et al. PPARgamma Activation Prevents Sepsis-Related Cardiac Dysfunction and Mortality in Mice: Drosatos et al: PPARgamma Treats Septic Cardiac Dysfunction. *Circulation Heart failure*. 2013;6(3):550-62.

49. Cross A. Endotoxin: Back to the Future. *crit Care Med.* 2016;Volume 44(2)(February 2016): p 450–1.
50. Klein SL, Roberts CW. *Sex and Gender Differences in Infection and Treatments for Infectious Diseases*: Springer; 2015.
51. Feng X, Wei H, Zeng Q, Zhang F, Xue Q, Yu B. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and prevents longterm cognitive impairment in septic rats. *European Journal of Anaesthesiology (EJA)*. 2015;30:186-.
52. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal Models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(10):854-65.
53. Disma N, Mondardini MC, Terrando N, Absalom AR, Bilotta F. A systematic review of methodology applied during preclinical anesthetic neurotoxicity studies: important issues and lessons relevant to the design of future clinical research. *Pediatric Anesthesia*. 2015;26(1):6-36.
54. Sakr Y, Elia C, Mascia L, Barberis B, Cardellino S, Livigni S, et al. The influence of gender on the epidemiology of and outcome from severe sepsis. *Critical Care*. 2013;17(2):R50-R.
55. ILAS. *Registro Brasileiro de Nutrição Parenteral – Estudo multicêntrico, prospectivo, observacional a fim de traçar o perfil da utilização da nutrição parenteral nas unidades de terapia intensiva brasileiras*. 2006.
56. Baruch M, Batzofin YGW, and Stephane F. Ledot. Do corticosteroids improve outcome for any critical illness? *Curr Opin Anesthesiol* 2013;Volume 26 (Number 2):164–70.
57. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(7):519-29.
58. Drechsler S, Weixelbaumer KM, Weidinger A, Raeven P, Khadem A, Redl H, et al. Why do they die? Comparison of selected aspects of organ injury and dysfunction in mice surviving and dying in acute abdominal sepsis. *Intensive Care Medicine Experimental*. 2015;3(1):1-21.
59. Everhardt Queen A, Moerdyk-Schauwecker M, McKee LM, Leamy LJ, Huet YM. Differential Expression of Inflammatory Cytokines and Stress Genes in Male and Female Mice in Response to a Lipopolysaccharide Challenge. *PLoS One*. 2016;11(4):e0152289.
60. Kozak W, Archuleta I, Mayfield KP, Kozak A, Rudolph K, Kluger MJ. Inhibitors of alternative pathways of arachidonate metabolism differentially affect fever in mice. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1998;275(4):R1031-R40.

61. D S. Thermoregulatory defense mechanisms. *Crit Care Med.* 2009 37(7 Suppl)::S203-10. .
62. James Li M, Wyatt Decker M, Mark A Silverberg M, Mark A Silverberg M, Jamie Alison Edelstein M, Francisco Talavera P, PhD, et al. Hypothermia 2016 [cited 2016 12 de maio de 2016]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/770542-overview#a5>.
63. Moraes CA, Santos G, Spohr TCdLeS, D Avila JC, Lima FRS, Benjamim CF, et al. Activated Microglia-Induced Deficits in Excitatory Synapses Through IL-1B: Implications for Cognitive Impairment in Sepsis. *Molecular Neurobiology.* 2014; 52(1): 653-63.
64. Tomasi CD, Vuolo F, Generoso J, Soares Mr, Barichello T, Quevedo Jo, et al. Biomarkers of Delirium in a Low-Risk Community-Acquired Pneumonia-Induced Sepsis. *Molecular Neurobiology.* 2016:1-5.
65. Xing C, Wang X, Cheng C, Montaner J, Mandeville E, Leung W, et al. Neuronal Production of Lipocalin-2 as a Help-Me Signal for Glial Activation. *Stroke.* 2014;45(7):2085-92.
66. Kundu P, Ling TW, Korecka A, Li Y, D'Arienza R, Bunte RM, et al. Absence of Intestinal PPAR γ Aggravates Acute Infectious Colitis in Mice through a Lipocalin-2-Dependent Pathway. *PLoS Pathog.* 2014;10(1):e1003887.
67. DrugBank. Rosiglitazone 2016 [cited 2016 12 de maio de 2016]. Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00412>.
68. Jin D, Guo H, Bu SY, Zhang Y, Hannaford J, Mashek DG, et al. Lipocalin 2 is a selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor- β activation and function in lipid homeostasis and energy expenditure. *The FASEB Journal.* 2010;25(2):754-64.
69. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2007;1773(8):1358-75.
70. Sattler R, Xiong Z, Lu W-Y, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M. Specific Coupling of NMDA Receptor Activation to Nitric Oxide Neurotoxicity by PSD-95 Protein. *Science.* 1999;284(5421):1845-8.
71. Zhou L, Li F, Xu H-B, Luo C-X, Wu H-Y, Zhu M-M, et al. Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95. *Nat Med.* 2010;16(12):1439-43.
72. Comim CM, Barichello T, Grandgirard D, Dal-Pizzol F, Quevedo Jo, Leib SL. Caspase-3 Mediates In Part Hippocampal Apoptosis in Sepsis. *Molecular Neurobiology.* 2013;47(1):394-8.

73. Comim CM, Constantino LC, Barichello T, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive Impairment in the Septic Brain. *Current Neurovascular Research*. 2009;6(3):194-203.
74. Schwalm MgT, Pasquali M, Miguel SP, dos Santos JoPA, Vuolo F, Comim CM, et al. Acute Brain Inflammation and Oxidative Damage Are Related to Long-Term Cognitive Deficits and Markers of Neurodegeneration in Sepsis-Survivor Rats. *Molecular Neurobiology*. 2014;49(1):380-5.