

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
BACHARELADO EM FARMÁCIA**

CAMILA FRANCIELI CHAGAS

**Avaliação do desempenho cognitivo e estresse oxidativo cerebral em
camundongos com sepse polimicrobiana**

**OURO PRETO
2024**

CAMILA FRANCIELI CHAGAS

**Avaliação do desempenho cognitivo e estresse oxidativo cerebral em
camundongos com sepse polimicrobiana**

Trabalho apresentado a Universidade Federal
de Ouro Preto como requisito para conclusão do
curso de Farmácia.

Orientadora: Prof. Dr. Daniela Caldeira Costa
Co-orientadora: Maria Laura da Cruz Castro

OURO PRETO

2024

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C433a Chagas, Camila Francieli.

Avaliação do desempenho cognitivo e estresse oxidativo cerebral em camundongos com sepse polimicrobiana. [manuscrito] / Camila Francieli Chagas. - 2024.

44 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara.

Coorientadora: Ma. Maria Laura da Cruz Castro.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Septicemia. 2. Metaloproteases. 3. Estresse Oxidativo. I. Calsavara, Daniela Caldeira Costa. II. Castro, Maria Laura da Cruz. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.94

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Francieli Chagas

Avaliação do desempenho cognitivo e estresse oxidativo cerebral em camundongos com sepse polimicrobiana.

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de farmacêutico generalista

Aprovada em 06 de fevereiro de 2024

Membros da banca

Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara (Orientadora - UFOP)
Ms. Maria Laura da Cruz Castro (Coorientadora - UFOP)
Dra. Natália Pereira da Silva Araújo (Membro - UFOP)
Dra. Flávia Monteiro Ferreira (Membro - UFOP)

Daniela Caldeira Costa Calsavara, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 19/02/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Caldeira Costa Calsavara, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 19/02/2024, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0669413** e o código CRC **8FAF8DBD**.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de ligação e perfuração cecal (CLP) em camundongo.....	6
Figura 2 - Alterações cognitivas manifestadas em pacientes pós sepse.....	7
Figura 3 - Percentual referente a sequela cognitiva.	8
Figura 4 - Processo de dano neuronal causado pela sepse.....	9
Figura 5 - Principais danos intracelulares causados pelos radicais livres.	12
Figura 6 - Delineamento do estudo experimental.....	15
Figura 7 - Curva de sobrevivência dos grupos SHAM e CLP	22
Figura 8 - Avaliação das concentrações de BDNF hipocampal.....	22
Figura 9 - Avaliação dos biomarcadores de dano oxidativo cerebral	24
Figura 10 - Atividade da MMP-9 no córtex cerebral	26
Figura 11 - Avaliação do perfil antioxidante cerebral.....	27
Figura 12 - Análise dos testes cognitivos de memória	29

LISTA DE SIGLAS

Ae	Alternâncias espontâneas
ATP	Trifosfato de Adenosina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
CCA	Centro De Ciência Animal da UFOP
CEUA	Comitê de Ética No Uso de Animais
CLP	Cirurgia de ligadura e perfuração do ceco
CREB	Fator De Transcrição Envolvido Na Regulação De Genes Envolvidos Na Remodelação Sináptica E Plasticidade Neuronal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERN's	Espécies Reativas De Nitrogênio
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
FIP	Peritonite bacteriana
GPx	Glutathione Peroxidase
H ₂ O ²	Peróxido De Hidrogênio
HO [•]	Radical Hidroxila
iNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase
IL	Interleucina - IL-1 (Interleucina1) e IL-6 (Interleucina6)
LPS	Infusão Intravascular De Endoxina
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	Proteína Quinase ativada por Ras/mitógeno
mBDNF	Forma madura do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
MEC	Matriz Extracelular Especializada
MMP-9	Metaloproteinase 9
MMP's	Metaloproteinases De Matriz
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Il)-2,5-Difeniltetrazólio
NFK-B	Fator De Transcrição Nuclear-Kappa B
NO	Óxido Nítrico
NOs	Óxido Nítrico Sintase
O ²⁻	Radical Superóxido

PAMP's	Sinais Moleculares Associados A Patógenos
próBDNF	Isoforma precursora do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
SHAM	Cirurgia Branca
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNF	Fator De Necrose Tumoral
TLR	Toll; TLR-2 para gram positivas e TLR-4 para gram negativas
tPA	Plasminogênio Tecidual
TrkB	Tropomiosina Quinase B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Fisiopatologia da sepse	4
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral.....	14
3.2 Objetivos específicos	14
4 METODOLOGIA.....	14
4.1 Animais.....	14
4.2 Delineamento experimental	15
4.3 Procedimento cirúrgico CLP e Cirurgia Branca	15
4.4 Análise das funções cognitivas e comportamentais	16
4.4.1 Teste de reconhecimento de novo objeto:	16
4.4.2 Teste labirinto em Y:	17
4.5 Dosagem de BDNF hipocampal	17
4.6 Avaliação dos biomarcadores de dano oxidativo cerebral.....	18
4.6.1 Dosagem de TBARS	18
4.6.2 Dosagem de Proteína Carbonilada	18
4.7 Atividade da Metaloproteinase-9 (MMP-9) Cerebral.....	19
4.8 Avaliação do perfil antioxidante	20
4.8.1 Atividade da Superóxido Dismutase.....	20
4.8.2 Atividade da catalase	20
4.9 Análise Estatística	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1 Avaliação da mortalidade na sepse	21
5.2 Avaliação da concentração de BDNF no hipocampo.....	22

5.3 Avaliação dos biomarcadores de dano oxidativo cerebral	24
5.4 Atividade da MMP-9 no córtex cerebral	25
5.5 Avaliação do perfil antioxidante cerebral	27
5.6 Avaliação dos testes cognitivos de memória	28
6 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

A sepse configura-se como uma alteração biológica oriunda de uma infecção em que o paciente manifesta uma resposta inflamatória bem maior à agressão inicial, resultando em disfunções orgânicas que pode levar o indivíduo ao óbito (JÚNIOR *et al.*, 2022).

A sepse representa um desafio significativo para a saúde pública em escala global. Estatísticas indicam que anualmente, entre 15 e 17 milhões de novos casos de sepse grave no mundo são diagnosticadas, resultando em aproximadamente 5 milhões de mortes (LOBO *et al.*, 2019). A crescente incidência da sepse está ligada a diversos fatores relacionados ao hospedeiro, incluindo o uso de terapias imunossupressoras e citotóxicas (maior em pacientes com câncer ou transplantados), a maior presença de patógenos e infecções resistentes, a realização de procedimentos invasivos, o envelhecimento da população e o aumento do número de pacientes com condições crônicas (GARRIDO *et al.*, 2004). Segundo o estudo multicêntrico SPREAD, pacientes com sepse grave e choque séptico ocupam um terço dos leitos de unidade de terapia intensiva, com uma letalidade geral de 55% (MACHADO *et al.*, 2017).

Já no Brasil, a sepse representa um desafio significativo para o sistema de saúde, com uma prevalência de sepse grave de 30% e a taxa de mortalidade intra hospitalar cerca de 55%, sendo apresentada como a principal causa de morte em UTI's não cardíacas (ALMEIDA *et al.*, 2022). Em um estudo conduzido em 2016, foram examinados os custos associados à hospitalização de pacientes diagnosticados com sepse e choque séptico que foram admitidos em uma unidade de Urgência e Emergência de um hospital universitário no Brasil. Os resultados revelaram que o tratamento desses pacientes é dispendioso, com uma média de custo de internação atingindo R\$38.867,60. Esse valor representa mais da metade do investimento total no tratamento da sepse em pacientes não sobreviventes (BARRETO *et al.*, 2016). Além disso, é necessário considerar o impacto econômico indireto para a sociedade, cuja estimativa é mais desafiadora. Isto inclui dias perdidos de trabalho, ausência nas escolas e as sequelas de longo prazo. (KURTZ *et al.*, 2016).

Portanto, torna-se evidente o impacto significativo da doença, especialmente no âmbito do sistema público de saúde. Isso é notável tanto pelos custos associados

ao tratamento quanto pela considerável ocupação dos leitos de terapia intensiva (ALMEIDA *et al.*, 2022).

Estudos clínicos indicam um comprometimento cognitivo de longo prazo em pacientes que sobreviveram a sepse, manifestando-se através de alterações na memória, concentração e atenção. Esse prejuízo global tem impactos significativos na qualidade de vida desses indivíduos (ANGUS *et al.*, 2001). Esse comprometimento se assemelha a quadros de Alzheimer e traumatismo crânio encefálico e é observado tanto em jovens quanto em idosos, mas ainda mais suscetível em idosos com distúrbios neurológicos pré-existentes, apresentando declínio cognitivo permanente e imediato (LEMAY *et al.* 2014).

No que diz respeito à fisiopatologia, foram identificados diversos mecanismos, que vão desde o dano oxidativo até desequilíbrios nos neurotransmissores. Isso abrange processos de neuroinflamação, disfunção tanto mitocondrial quanto vascular, bem como aspectos como o fluxo sanguíneo cerebral e a integridade da barreira hematoencefálica (BHE). Também se incluem alterações sistêmicas como hipotensão e febre, juntamente com a resposta imune à sepse, envolvendo a produção de mediadores inflamatórios (KURTZ *et al.*, 2016).

Nesse cenário, o estresse oxidativo emerge devido à produção descontrolada de radicais livres, provocando um desequilíbrio na proporção entre agentes oxidantes, como as espécies reativas ao oxigênio (ERO's), e agentes antioxidantes. A capacidade das células de mitigar os efeitos do estresse oxidativo depende do equilíbrio entre substâncias oxidativas e a produção de agentes antioxidantes pelo organismo (BARICHELLO *et al.*, 2007). Esse desequilíbrio oxidativo contribui para a intensificação da neuroinflamação, uma vez que a produção excessiva de substâncias reativas ao oxigênio pode amplificar os processos patológicos mediados pelas metaloproteinases de matriz (MMPs), exacerbando os danos à BHE e o influxo de mediadores neurotóxicos no cérebro (BARICHELLO *et al.*, 2007).

Portanto, esse trabalho tem como importância aprofundar o entendimento sobre o impacto do estresse oxidativo cerebral nas alterações cognitivas causadas pela sepse, vislumbrando o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes, que possibilitem novas perspectivas para o aprimoramento do manejo de pacientes com sepse.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fisiopatologia da sepse

Sabe-se que a resposta inflamatória pode ser iniciada com a infecção, onde ocorre a proliferação de microrganismos que produzem toxinas, tais como exotoxinas, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (LPS) (ZARBOCK et al., 2014). Estas substâncias são identificadas pelo sistema imune inato, especialmente pelos macrófagos, quando há variações na quantidade dessas estruturas moleculares (conhecidas como sinais moleculares associados a patógenos, ou PAMPs), por meio dos receptores tipo Toll (TLR; TLR-2 para gram-positivas e TLR-4 para gram-negativas) (MANCEK-KEBER et al., 2015). Isso desencadeia a ativação do fator de transcrição nuclear-kappa B (NFK-B), levando à transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, ocorre a liberação do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF) e da Interleucina-1 (IL-1), acompanhados de IL-6, iniciando uma resposta celular intensa que inclui a ativação de granulócitos, liberação de mensageiros secundários e quimiotaxia. Esses mensageiros contribuem para a perpetuação de um ciclo inflamatório persistente, uma vez que são responsáveis por reativar a cascata inflamatória e as células fagocitárias. Isso resulta em uma sequência de reações e rotas metabólicas que culminam na produção e liberação de substâncias pró-inflamatórias, o que leva a danos celulares. É importante ressaltar que na sepse ocorre um desequilíbrio no consumo de oxigênio disponível, o que pode resultar em hipóxia tecidual. Esse fenômeno se dá devido à priorização do oxigênio em áreas vitais do corpo, como o cérebro e o coração, o que acaba afetando o fluxo sanguíneo e a microcirculação, podendo levar à síndrome de disfunção de múltiplos órgãos. (GOLDIM et al., 2018). Adicionalmente, devido à disfunção das mitocôndrias, ocorre uma falência dos órgãos, levando a um déficit de oxigênio ainda mais acentuado nos tecidos (BARONE et al. 2014).

2.2 Modelo animal de sepse

Estudos com modelos animais de sepse tem permitido entender melhor os mecanismos fisiopatológicos, com base na reação inflamatória a uma infecção

(SHRUM *et al.*, 2014). Na literatura são descritos vários modelos, e cada um deles apresentam vantagens e desvantagens. Dentre os modelos utilizados na literatura, tem-se a infusão intravascular de endotoxina ou bactérias vivas (LPS), onde o animal é exposto a endotoxinas gram-negativas. A desvantagem desse modelo é que não há uma proliferação com indução de patógeno (HOOGLAND *et al.*, 2015). Já no modelo de peritonite bacteriana (FIP), o animal é submetido a uma injeção contendo material fecal de outro animal doador e isso provoca uma sepse polimicrobiana, em consequência de uma peritonite aguda (SHRUM *et al.*, 2014).

O modelo de ligação e perfuração cecal (CLP) é reconhecido como aquele que mais fielmente reproduz a complexidade da doença. Isso se deve ao fato de que ele melhor reflete o curso e a natureza da sepse humana. Além disso, é um modelo altamente reprodutível e fornece uma detalhada compreensão do organismo (CORRÊA *et al.*, 2012). Há três tipos de danos apresentados nesse modelo: (1) laparotomia (abertura abdominal), o que causa dano tecidual; (2) ligação do ceco, causando necrose; e (3) extravasamento de fezes para a cavidade abdominal, gerando uma infecção (DEJAGER L *et al.*, 2011). Neste modelo é possível mimetizar as alterações inflamatórias e cardiovasculares (EBONG *et al.*, 2008), além de ser o que mais se assemelha ao quadro de sepse decorrente de problemas clínicos como diverticulite, apendicite perforada, colite ou peritonite pós-operatória (GARRIDO *et al.*, 2004). No processo cirúrgico o ceco é ligado por um fio de sutura e perfurado, o que permite o extravasamento do material fecal para a cavidade abdominal (Fig.1). A severidade da sepse será definida conforme a quantidade de fezes extravasada, da quantidade de perfurações realizadas ou pela variação do calibre da agulha. Além de se assemelhar ao quadro humano de sepse, sua vantagem é a sua simplicidade, isto é, não há necessidade de cultivar e quantificar bactérias. Além disso, fatores como o gênero, a idade e o controle apropriado da tensão da ligadura são cruciais para a realização adequada do experimento (SJAASTAD *et al.*, 2020).

Figura 1 - Modelo de ligação e perfuração cecal (CLP) em camundongo



Fonte: Diário Jove, 2021.

Portanto, é importante a investigação experimental com base em um modelo animal que apresente semelhanças com a situação clínica em humanos (GOLDIM et al., 2018). Pesquisas realizadas por SAVI et al., (2021) evidenciaram o uso do modelo CLP para investigar o comprometimento cognitivo relacionado à sepse. Esse tipo de indução provocou a ativação microglial e inflamação cerebral. Um estudo adicional que sustenta essa abordagem é o de Sousa e colaboradores (2019), que examinou os mecanismos moleculares associados ao prejuízo cognitivo tardio em um modelo de sepse em camundongos, utilizando o modelo CLP. Os resultados obtidos indicam prejuízo cognitivo e sináptico relacionado à inflamação cerebral e ativação microglial.

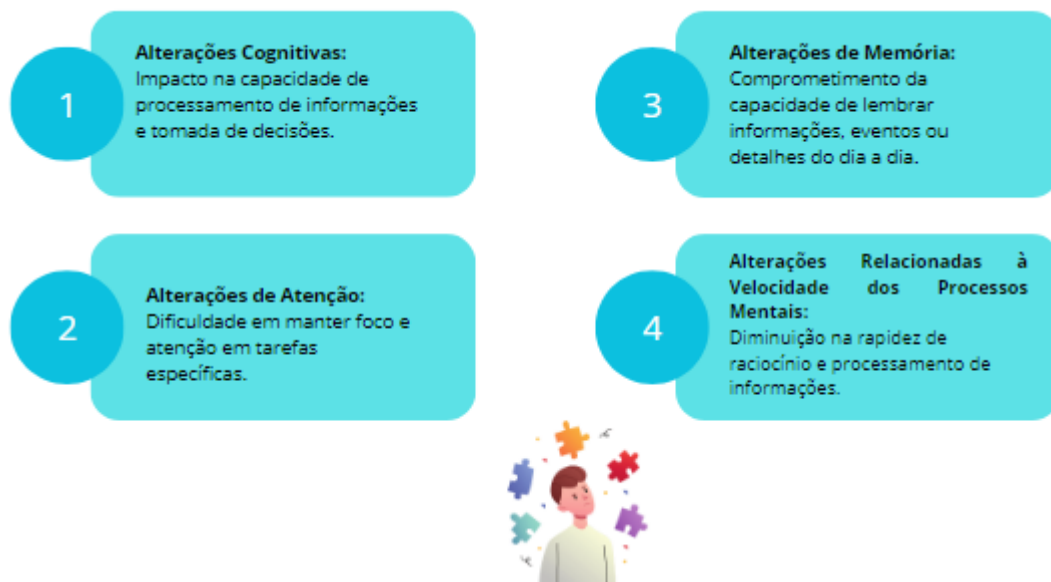
2.3 Disfunção cerebral associada à sepse

A disfunção cerebral na sepse deriva de diversos mecanismos ligados à resposta inflamatória e são desencadeadas por sinais mediados por três vias: a via humoral, em que as citocinas transmitem respostas ao cérebro através da BHE, órgãos circuventriculares e plexo coroide; a via neural, que requer a ativação do sistema nervoso aferente; e as alterações estruturais na BHE, resultando em aumento da permeabilidade a substâncias da corrente sanguínea (GOLDIM et al., 2018).

O comprometimento cognitivo está diretamente ligado a limitações físicas, maior taxa de mortalidade e redução na qualidade de vida. Esta é uma condição que

pode afetar até dois terços das pessoas que sobrevivem a esse estado crítico, apresentando uma variedade de manifestações clínicas distintas (Fig. 2) (PIZZOL, 2023).

Figura 2 - Alterações cognitivas manifestadas em pacientes pós sepse.



Fonte: Autoria própria adaptado de PIZZOL, 2023.

Para aqueles que permanecem com alterações do funcionamento cerebral após a sepse, é possível observar uma gama de sintomas que abrangem diversas áreas cognitivas. Essas alterações, especialmente as relacionadas à memória e à velocidade de processamento do pensamento, podem interferir significativamente na capacidade do indivíduo de realizar tarefas diárias, lembrar nomes e responder prontamente a estímulos do ambiente (PIZZOL, 2023). Foi conduzido um estudo observacional transversal pela Revista Científica do Hospital Santa Rosa, no período de julho a novembro de 2021, com o objetivo de avaliar a qualidade de vida após a alta hospitalar em pacientes que superaram a sepse e choque séptico. Quanto às sequelas cognitivas, a análise revelou que a incidência foi de 15% nos pacientes que enfrentaram sepse, enquanto no grupo de choque séptico, essa porcentagem foi mais significativa, alcançando 40% (Fig. 3).

Figura 3 - Percentual referente a sequela cognitiva.

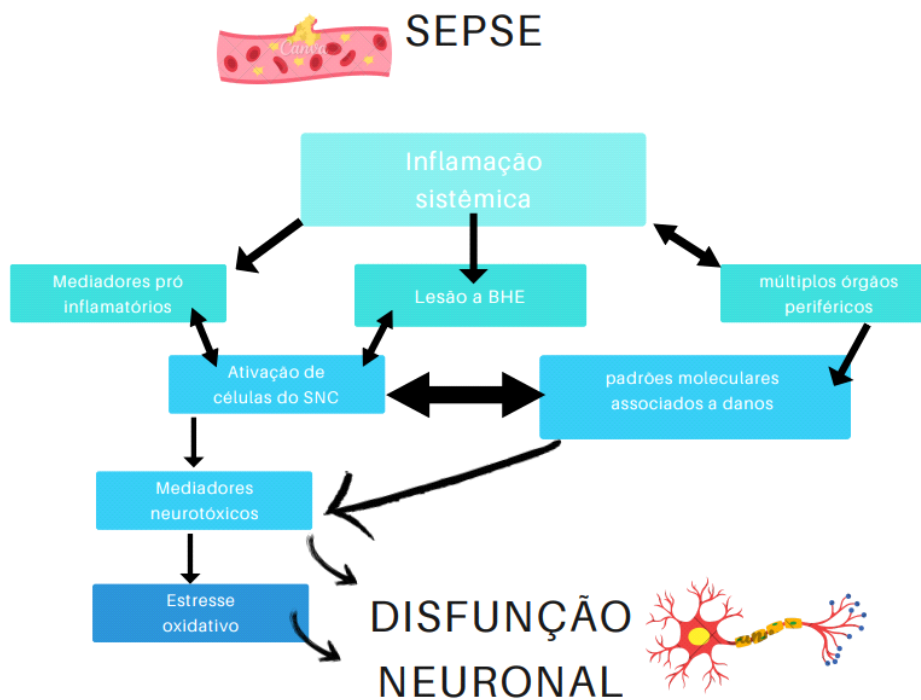


Fonte: Coorte – Revista, Número 14, 2022

No estudo de Roma (2014), as alterações de memória foram predominantemente relatadas, sendo observadas especialmente três meses após a alta hospitalar. Já nos registros de choque séptico, as dificuldades abrangeram não apenas a memória, mas também afetaram a atenção e a compreensão.

Mesmo em indivíduos saudáveis, alterações na memória e no aprendizado estão associadas com aumento nos níveis da proteína C reativa e de mediadores inflamatórios. Um dos mecanismos subjacentes à geração de danos no Sistema Nervoso Central (SNC) e ao subsequente comprometimento cognitivo é a neuroinflamação. Essa condição é desencadeada pelo aumento na liberação de mediadores inflamatórios e, juntamente com a ativação das células microgliais, intensifica o processo inflamatório local (Fig. 4). (GOLDIM et al., 2018).

Figura 4 - Processo de dano neuronal causado pela sepse.



Fonte: Autoria própria, adaptado de Lin et al. 2022.

É essencial destacar também o papel do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF). Pertencente à linhagem das neurotrofinas, ele está amplamente distribuído pelo cérebro, principalmente no hipocampo, e variações nos seus níveis estão associadas a disfunções neurológicas (SANTOS et al., 2021). O BDNF está envolvido em mecanismos que podem afetar a função cognitiva, como proteção neuronal, regulação de interações sinápticas de curta e longa duração, bem como na modulação da formação de células gliais e neurônios (KOWIAŃSKI et al., 2018). Existem duas formas dele: a isoforma precursora (próBDNF) e a forma madura (mBDNF), esta última resultante de processos de clivagem intracelular pela furina e extracelular pelas MMPs 2 e 9, além da plasmina. Suas ações fisiológicas diferem, já que o próBDNF se acopla a componentes que podem levar à morte celular, como a sortilina e a neurotrofina p75, promovendo apoptose. Enquanto isso, o mBDNF tem efeitos opostos, unindo-se ao receptor tropomiosina quinase B (TrkB), o que induz atividade sináptica, crescimento e, conseqüentemente, melhoria da sobrevivência neuronal (BAZZARI et al., 2022).

Tanto a neuroinflamação quanto o estresse oxidativo podem estar envolvidos na regulação adversa do BDNF. Estudos mostraram que a ativação da microglia induzida pela anestesia e cirurgia, assim como a liberação de IL-6, resultou na

diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo (Szaflarski et al., 2016). Em relação ao estresse oxidativo, uma pesquisa conduzida por Della Giustina et al. (2020) em ratos Wistar submetidos a CLP, evidenciou estresse oxidativo no tecido cerebral associado à redução dos níveis de BDNF. A interação do BDNF com o receptor TrkB desencadeia a ativação da proteína quinase ativada por Ras/mitógeno (MAPK), resultando na liberação da neurotrofina dependente da proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB). O CREB é um fator de transcrição responsável pela regulação da expressão de genes envolvidos na remodelação sináptica e plasticidade neuronal. Em situações de estresse oxidativo, a capacidade do CREB de se unir ao ácido desoxirribonucleico (DNA) pode ser prejudicada, o que leva à redução da expressão de BDNF (DELLA GIUSTINA, 2017).

A BHE tem como missão proteger o cérebro contra a penetração de macromoléculas hidrofílicas (como citocinas e células do sistema imunológico) e patógenos. Ela é composta por células endoteliais que revestem os capilares cerebrais e está localizada no capilar cerebral, formado por endotélio e lâmina basal. A BHE tem a capacidade de ajustar seletivamente a permeabilidade de substâncias que entram no parênquima cerebral, graças às junções oclusivas, proporcionando maior seletividade para partículas nocivas, substâncias essenciais para o funcionamento neuronal e medicamentos (GOLDIM et al., 2018).

As células endoteliais apresentam estruturas cruciais, como as junções apertadas e as junções aderentes, que atuam como barreiras para a difusão de moléculas. Enquanto as junções aderentes estão ligadas a moléculas de adesão celular, as junções apertadas são formadas por proteínas associadas à membrana (SWEENEY et al., 2018).

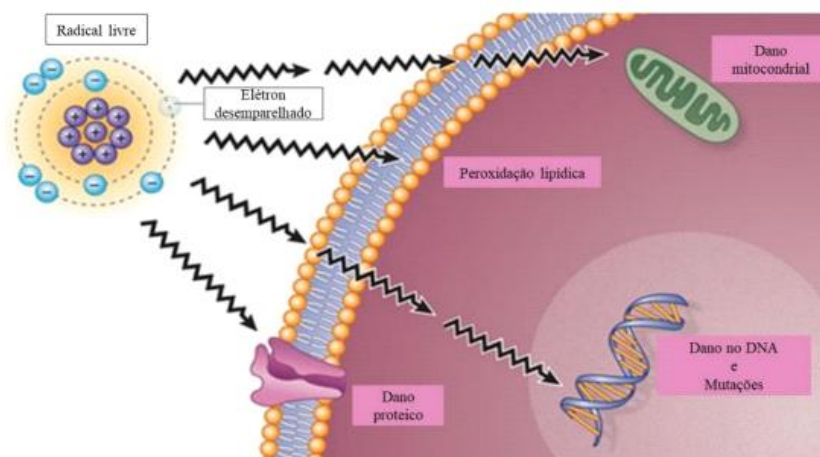
Devido ao aumento dos níveis de citocinas, espécies reativas de oxigênio (ERO's) e espécies reativas de nitrogênio (ERN's), ocorre a ativação das MMP's, que são enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação das junções endoteliais e junções apertadas. Essas proteínas intercelulares desempenham um papel crucial no controle da permeabilidade da BHE (GOLDIM et al., 2018). As gelatinases (MMP-2 e MMP-9), em particular, demonstram alta especificidade na interação com componentes da lâmina basal, como o colágeno tipo IV, a laminina e a fibronectina, sendo capazes de degradar as membranas basais (YANG et al., 2019). Em condições normais, as MMP's são ativadas por meio de processos de fosforilação no interior da

célula. Na maioria dos casos, essa ativação é conduzida por proteases ou pelas próprias MMP's (REMPE et al., 2016).

Vale destacar também a contribuição das MMP's na ativação das vias neuroinflamatórias, por meio de enzimas como citocinas e moléculas de adesão celular. Além disso, a neuroinflamação pode desencadear processos de neurotoxicidade ao liberar moléculas sinalizadoras de morte, como o ligante Fas, que impactam nos níveis de glicina e GABA. (REMPE et al., 2016).

O estresse oxidativo origina-se quando há uma produção descontrolada de radicais livres que altera o equilíbrio entre oxidantes, como as ERO's e antioxidantes, favorecendo os oxidantes (Fig. 5) (CRUZ-RODRIGUES, 2019). Em condições aeróbicas, a maior parte do oxigênio no organismo é convertida em água pela enzima citocromo oxidase na cadeia transportadora de elétrons, sem a liberação de moléculas reativas. No entanto, uma pequena porção de oxigênio é reduzida para formar o radical superóxido (O_2^-), que é um tipo de ERO. Esse radical pode então passar por uma sequência de reações para se transformar em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é outra ERO. O H_2O_2 é mais reativo que o O_2^- e pode atravessar facilmente as membranas celulares. Posteriormente, o H_2O_2 pode se transformar em radical hidroxila (HO^*) e íon hidroxila (OH^-), e finalmente reagir para formar uma molécula de água. Além das ERO's, também existem moléculas reativas de nitrogênio (ERN's) que são formadas durante processos metabólicos. Entre elas, destaca-se o óxido nítrico (NO), que é gerado a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina pela enzima NO sintase (iNOS). Em certas circunstâncias, a ativação da enzima NOS induzível (iNOS) pode levar à produção constante de NO em quantidades elevadas, causando danos nos tecidos (RODRIGUES, 2017).

Figura 5 - Principais danos intracelulares causados pelos radicais livres.



Fonte: Oumere, 2019.

Para contrabalançar a geração de moléculas reativas, o organismo dispõe de mecanismos de defesa antioxidante. Isso envolve catalisadores como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), que trabalham em conjunto com outros antioxidantes não-enzimáticos para resguardar as células contra danos oxidativos (SULZBACHER et al. 2020). A SOD converte O_2^- em H_2O_2 e O_2 . Já a CAT e a GPx transformam o H_2O_2 em H_2O (COBB et al., 2015).

O estresse oxidativo favorece o estado pró-inflamatório devido à sua capacidade de causar lesões no endotélio e isso pode resultar em danos às células, impactando principalmente na membrana celular, que é altamente suscetível à peroxidação lipídica. Isso ocasiona modificações na estrutura e na permeabilidade das membranas, levando à liberação do conteúdo das organelas e à formação de produtos citotóxicos, o que pode culminar na morte celular (RODRIGUES, 2017). Adicionalmente, as proteínas celulares também podem ser afetadas, resultando em alterações em sua estrutura e função. O dano oxidativo também pode se estender ao núcleo celular, prejudicando o DNA e comprometendo os processos de reparação (BAILO et al. 2022).

O estresse oxidativo pode causar danos mitocondriais, levando a uma redução na capacidade respiratória dos tecidos devido ao desacoplamento parcial da fosforilação oxidativa mitocondrial. Isso resulta em níveis reduzidos de trifosfato de adenosina (ATP), que é a principal fonte de energia intracelular, e aumento nos níveis de lactato no sangue. Essa elevação do lactato é considerada um indicador de prognóstico de mortalidade na sepse (LOUREIRO, 2020). A insuficiência energética nas células está diretamente associada à liberação de íons cálcio das reservas

intracelulares e ao início do processo de apoptose, o que contribui para o comprometimento funcional de múltiplos órgãos observados na sepse (RODRIGUES et al. 2017).

Embora todas as células possam sofrer danos oxidativos, o cérebro é particularmente susceptível devido ao seu alto consumo de oxigênio, às defesas antioxidantes modestas, ao elevado gasto energético e demanda metabólica, além do fato das membranas neuronais serem ricas em ácidos graxos polinsaturados (BAILO et al., 2022). Estudos experimentais realizados por COMIM CM (2011) e colaboradores evidenciaram que os animais que sobreviveram à sepse, após 10 dias de indução pelo método de CLP, apresentavam modificações nas enzimas mitocondriais e danos oxidativos. Em outra investigação em ratos, realizada entre seis a 12 horas após o desencadeamento de sepse polimicrobiana severa, foi observada lesão em proteínas e lipídeos, assim como uma redução na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD, em diferentes estruturas cerebrais (PEREZ et al., 2014). O desequilíbrio oxidativo, portanto, pode desencadear uma variedade de processos inflamatórios, podendo perdurar ao longo do curso clínico do paciente, sendo também apontado como um dos mecanismos responsáveis pelo comprometimento cognitivo de longo prazo após a sepse (NWAFOR et al., 2019). Diante disso, torna-se crucial a investigação dos processos que podem afetar a integridade da BHE, favorecendo o desequilíbrio redox cerebral e o comprometimento cognitivo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho cognitivo e o perfil redox cerebral em camundongos sépticos da linhagem C57BL6.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a mortalidade na sepse;
- Realizar os testes cognitivos de memória;
- Avaliar a concentração de BDNF no hipocampo;
- Avaliar os biomarcadores de dano oxidativo cerebral;
- Avaliar a atividade da metaloproteinase 9 (MMP-9) cerebral;
- Avaliar o perfil antioxidante cerebral.

4 METODOLOGIA

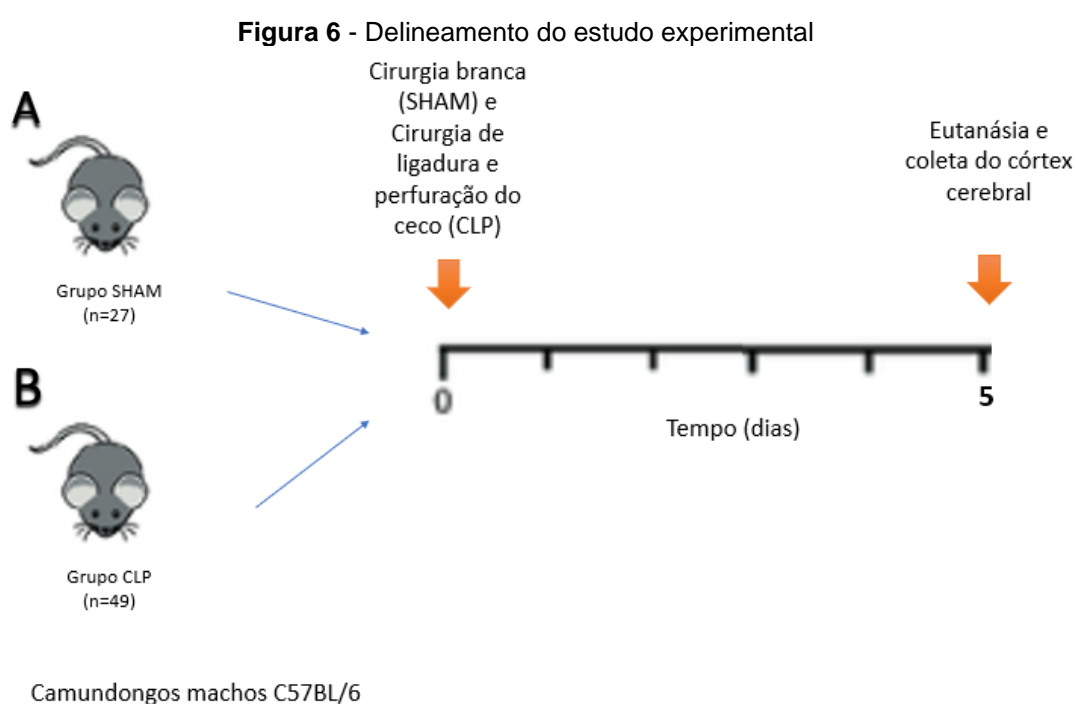
4.1 Animais

Para realização deste estudo, foram utilizados 76 camundongos isogênicos C57BL/6 machos, com 8 a 12 semanas de idade, oriundos do Centro de Ciência Animal da UFOP (CCA). Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob o número de protocolo 1310110521.

Os camundongos foram alojados em gaiolas com até 5 animais por gaiola e colocados em sala específica para manutenção dos camundongos, com temperatura controlada ($23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), umidade relativa de 50 a 70% e ciclo automatizado de 12 h claro e 12 h escuro. Os animais receberam dieta padrão (Nuvilab CR-Quimtia) e água potável ad libitum durante todo o experimento.

4.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em dois grupos: Grupo 1: animais submetidos a cirurgia branca (SHAM) (grupo controle) (n= 27); Grupo 2: animais submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) (n= 49). Os animais foram acompanhados durante 05 dias. No penúltimo dia, foram realizados os testes cognitivos e no quinto dia, os animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta do cérebro.



Fonte: Elaborado pela autora

4.3 Procedimento cirúrgico CLP e Cirurgia Branca

Tanto a CLP, quanto a SHAM ocorreram conforme protocolo padronizado por CALSAVARA *et al.*, 2015. Os animais foram sedados e anestesiados com xilazina e cetamina. Após confirmar a ausência de resposta a estímulos externos, foi executada a antissepsia seguida da tricotomia da região abdominal. A seguir, os animais foram colocados em decúbito dorsal com a cabeça orientada na direção contrária ao cirurgião e, posteriormente, foi realizado uma incisão longitudinal, na linha média abdominal. O ceco foi encontrado com o auxílio de uma pinça anatômica, exteriorizado deixando o restante do intestino delgado e grosso dentro da cavidade peritoneal. Em

seguida, iniciou-se a ligadura do ceco com fio para sutura abaixo da válvula ileocecal. Depois, foi feito um furo no ceco utilizando uma agulha 21G no ponto médio entre a ligadura e a ponta distal do ceco na direção mesentérica-antimesentérica. Após isso, foi feita a extrusão de uma pequena gotícula de fezes tanto dos furos mesentéricos quanto antimesentéricos para que sua patência seja garantida, e o ceco foi realocado no interior da cavidade abdominal. Por meio de uma sutura, a incisão longitudinal foi fechada. Por fim, foi realizada a ressuscitação volêmica com administração subcutânea de solução salina pré-aquecida a 37° C na dose de 0,5 mL/10g. Os animais do grupo SHAM foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos, entretanto, o ceco não foi perfurado e/ou ligado. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal em uma manta térmica e observados até acordarem da anestesia. Quando tiveram a capacidade de virar de forma independente em decúbito ventral, foi a indicação de que acordaram. Sendo assim, em seguida, foram realocados para caixas de polipropileno e acompanhados duas vezes ao dia para o registro da mortalidade após a cirurgia.

4.4 Análise das funções cognitivas e comportamentais

Os animais foram submetidos aos testes cognitivos e comportamentais no penúltimo dia. Os testes executados foram o Teste de reconhecimento de novo objeto e o labirinto em Y.

4.4.1 Teste de reconhecimento de novo objeto:

O teste de reconhecimento de novo objeto baseia-se na predileção dos roedores em explorar novos objetos em relação aos familiares. Para o teste, os animais foram colocados em um campo aberto com uma área retangular (40 cm de largura x 60 cm de comprimento x 20 cm de altura) feita de acrílico com o piso dividido em 9 quadrantes. A primeira etapa foi a habituação, onde, o animal foi colocado no quadrado do canto posterior esquerdo do campo aberto vazio e ele ficou livre para explorar por 5 minutos. 24 horas após, foi iniciado a familiarização, onde, os roedores foram colocados no campo aberto que continha 2 objetos idênticos em forma, tamanho e cor (A e B) e os animais tiveram livre acesso para explorar esses objetos

por 5 minutos e o tempo gasto na exploração de cada objeto foi anotado. Após 6 horas da etapa de familiarização, o próximo passo foi a sessão de teste, onde um dos objetos da etapa da familiarização foi substituído por um novo objeto (C) diferente em forma, tamanho e cor e foi ser contabilizado o tempo que o animal explorou cada objeto. O resultado foi expresso como índice de reconhecimento e o cálculo foi feito usando a seguinte fórmula matemática:

(Tempo de exploração do objeto novo – tempo de exploração do objeto familiar) / (Tempo de exploração do novo objeto + tempo de exploração do objeto familiar).

4.4.2 Teste labirinto em Y:

O teste de Labirinto em Y mede a memória operacional espacial e pode ser utilizado para avaliar a memória de curto prazo em camundongos. No teste de labirinto em Y, foi utilizado um labirinto em forma de Y com três braços iguais, medindo 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento. O animal foi colocado em um dos braços do labirinto e ficou livre para explorar o labirinto por 5 minutos. Então, um animal que possui uma boa memória de trabalho se lembraria dos braços visitados anteriormente e mostraria uma tendência a entrar em um braço menos visitado. Foi calculada então a alternância espontânea (Ae) que ocorreu quando o animal entrou de forma consecutiva e sem repetições em cada um dos três braços diferentes do labirinto, executando então uma tríade.

$$Ae = \left(\frac{\text{Número de Alternâncias realizadas}}{\text{Chance de realizar uma alternância}-2} \right) * 100, \text{ onde:}$$

Ae = Porcentagem de Alternância Espontânea

4.5 Dosagem de BDNF hipocampal

Nesse método, a quantificação de BDNF foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático, conforme as recomendações do kit BDNF Total Quantikine™. Foi homogeneizado 30 mg do hipocampo em 300 µL de PBS, seguido da centrifugação

por dez minutos, 10.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi coletado. 50 µL de amostra (diluída 6x) foram adicionados em uma placa pré-revestida com um anticorpo monoclonal específico para BDNF. Logo depois, esta placa foi incubada sob agitação em temperatura ambiente por duas horas. Ao cumprir o tempo de incubação, cada poço da placa foi aspirado e lavado quatro vezes com tampão de lavagem. Prosseguindo com o protocolo, 200 µL de um anticorpo monoclonal ligado a enzima específico para BDNF foi adicionado aos poços e a placa foi incubada sob agitação em temperatura ambiente durante 1 hora. Em seguida, a placa foi lavada novamente e foi adicionado 200 µL de solução de substrato a cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos protegida da luz. Após esse período, foi adicionado a cada poço 50 µL da solução de parada. As leituras das reações foram feitas utilizando espectrofotômetro (450nm) e correção do comprimento de onda a 570 nm.

4.6 Avaliação dos biomarcadores de dano oxidativo cerebral

4.6.1 Dosagem de TBARS

A concentração do biomarcador de dano oxidativo TBARS foi realizada através da ligação do ácido tiobarbitúrico (TBA) aos lipídios oxidados. Desse modo, 50mg de tecido cerebral foram homogeneizados em 200 µl de tampão Tris/HCl. 150 µL de amostra, 75 µL de ácido tricloroacético (TCA) (10%), 75 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 37,5 µL de hidroxitolueno butilado (BHT) foram misturados e incubados a 95 °C por 15 minutos. Em seguida, essa combinação foi colocada no gelo por 5 minutos. Logo após, 200 µL da amostra foram transferidos para um tubo novo de 1,5 mL e foi adicionado 200 µL de butanol. Essa mistura foi agitada em vórtex e centrifugada a 4 °C a 13.000 rpm por 10 minutos. Foi retirado 200 µL do sobrenadante e distribuído em uma placa de 96 poços. Em seguida, a leitura foi feita no espectrofotômetro a 535 nm. Foi realizado o cálculo da concentração de TBARS por meio da equação da reta obtida da curva padrão de TMP (500 µM) e, esse valor encontrado foi dividido pela quantidade de proteínas.

4.6.2 Dosagem de Proteína Carbonilada

Para a dosagem da proteína carbonilada, foi utilizado o método onde se usa a 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH), que reage com grupos carbonila para a geração de hidrazona que pode ser analisada espectrofotometricamente. 500 µL de amostra foram precipitadas colocando TCA (10%) 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e HCl (2 M) em temperatura ambiente, por 30 minutos. O precipitado foi ressuspenso em TCA a 10% e centrifugado a 500 rpm por 5 min a 4 °C. Em seguida, o precipitado foi lavado com etanol-acetato de etila (1: 1 v / v) por duas vezes e, após isso, foi dissolvido em SDS a 6% e centrifugado novamente a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. Em 320 nm, foi feita a leitura da absorbância do sobrenadante. Os resultados foram expressos como nmoles de grupos carbonil por miligrama de proteína.

4.7 Atividade da Metaloproteinase-9 (MMP-9) Cerebral

Para a avaliação da MMP-9 foi utilizado a zimografia de gelatina. 50 mg de tecido cerebral foram homogeneizados em 200 µL de tampão RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1% IGEPAL, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, pH 8,0) e coquetel inibidor de protease (1:1000). Logo após a homogeneização, foi feita a centrifugação em um intervalo de dez minutos, 10.000xg a 4°C e o sobrenadante foi coletado. Posteriormente, utilizando o kit comercial e acompanhando o protocolo fornecido pelo fabricante, foi realizada, pelo método de BCA, a análise quantitativa da concentração de proteínas totais. Com os valores de proteínas, foi possível realizar tanto o cálculo do volume necessário para atingir 30µg de proteínas de cada amostra, quanto o cálculo de volume necessário de tampão RIPA (sem inibidor de protease) e tampão de amostra (6X) para SDS-PAGE. Assim, a zimografia foi executada utilizando gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 8% copolimerizado com gelatina do tipo A de pele suína (2mg/mL), e gel de empilhamento a 5% (w/v). Para isso, foram utilizadas placas de 0,75mm. Depois, foi colocado no gel 3 µL do padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standars, Bio-Rad) e 5 µL de amostra que continha 30µg de proteínas. Por dois minutos as amostras foram aquecidas a 37°C antes de serem colocadas no gel. Foi realizada a corrida de eletroforese a 100v por 120 minutos e após essa etapa, com o objetivo de remover o SDS, os géis foram lavados três vezes por 20 minutos com Triton X-100 a 2,5%. O protocolo seguiu com os géis sendo incubados por 36 horas a 37°C com solução de incubação (50mM Tris-HCl; 0,15M de NaCl; 5mM de

CaCl₂). Na última etapa, os géis foram corados com Coomassie Brilliant blue G-250 a 0,05% ao longo de três horas e descorados com solução de descoloração (4% metanol, 8% ácido acético e água). Na técnica de zimografia, as bandas claras representam a atividade proteolítica da enzima. O software Image J (versão 6) foi utilizado para a quantificação e detecção da densidade óptica de cada banda.

4.8 Avaliação do perfil antioxidante

4.8.1 Atividade da SOD

Neste método, a enzima SOD compete com o O^{2•-}, formado pela auto-oxidação do pirogalol, responsável pela redução do MTT a cristais de formazan. Resumidamente, foi necessário homogeneizar 50mg de tecido cerebral em 500 µL de tampão fosfato pH 7.2 0.1M, seguido de centrifugação por 10 minutos, a 4 °C em uma velocidade de 10.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado para dosagem. Foi adicionado 30µL da amostra diluída 20 vezes, 15 µL de tampão pirogalol, 99µL de tampão fosfato pH 7.2 0.1M e 6µL de MTT na placa de 96 poços. A placa foi incubada por 5 minutos em uma estufa de 37 °C. Após esse tempo, com o intuito de parar a reação, foi colocado 150µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e foi feita a leitura das absorbâncias, a 570nm, em leitor de ELISA. Em relação aos cálculos, as absorbâncias foram subtraídas pelo valor do branco. Esse valor subsequente foi dividido pela absorbância do padrão e o resultado encontrado foi multiplicado pelo fator de diluição. O valor encontrado foi dividido pela quantidade de proteínas totais de cada amostra. Os resultados foram expressos em U de SOD por mg de proteína, onde a unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do MTT.

4.8.2 Atividade da catalase

A atividade da CAT foi determinada com base em sua capacidade de hidrolisar H²O² em água e oxigênio molecular (AEBI, 1984). Para esta técnica, foi homogeneizado 500 µL de tampão fosfato pH 7.4 10mM em 50mg de tecido cerebral,

seguido de centrifugação por 10 minutos, a 4 °C em uma velocidade de 10.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado. Em seguida, foi adicionado em uma cubeta de Quartzo 990µL da solução de trabalho e 10µL da amostra. A absorbância em um comprimento de onda de 230nm, foi determinada a cada trinta segundos, durante dois minutos. Em relação ao branco, foi utilizado (H₂O₂) e tampão fosfato de potássio (pH 7.0, 50mM). Antes de começar o teste, foi verificado se a concentração da solução de trabalho foi de 10mM. A atividade da CAT foi calculada usando a absorbância delta ao longo de 2 min (absorbância final – absorbância inicial / 2) e o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ ($\epsilon = 39,4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); sendo que 1 U de CAT foi equivalente à hidrólise de 1 µmol de H₂O₂. Os resultados foram expressos em nmol por mg de proteína.

4.9 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas considerando $p < 0,05$ como valor de significância e foi utilizado o software GraphPad Prism versão 8.0. A normalidade foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, foi realizado o teste T de *Student* e os dados representados como média \pm erro padrão da média. Para a análise estatística da sobrevida foi utilizado o teste de Log-rank.

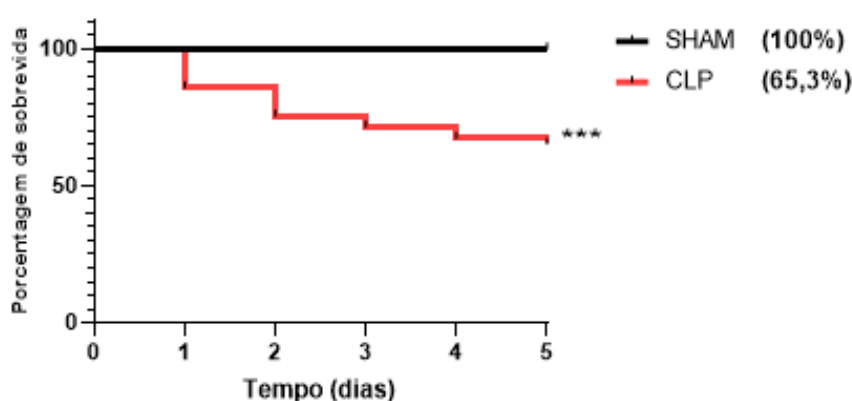
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da mortalidade na sepse

Para avaliar a mortalidade da sepse, os animais foram acompanhados duas vezes ao dia e foi feito o registro da mortalidade. Desse modo, foi observado que o grupo SHAM obteve taxa de sobrevida de 100% em comparação ao grupo CLP, que obteve uma taxa de sobrevida de 65,3%, o que evidencia diferenças significativas na sobrevida dos animais (Fig. 7). Esse resultado está de acordo com a pesquisa de Patel et al. (2020), na qual camundongos albinos suíços fêmeas foram submetidos à indução de sepse por CLP, resultando em uma elevação nas taxas de mortalidade, decorrente da indução da sepse. A sepse é decorrente de uma resposta inflamatória

desregulada, gerando um estado de desequilíbrio entre as espécies pró e anti-inflamatórias (RADDATZ et al., 2023). A maior mortalidade no grupo de animais induzidos à sepse em comparação com o grupo controle pode ser atribuída a uma resposta inflamatória descontrolada e ao fato de a sepse ser caracterizada por uma fase pró-inflamatória, um estado pró-coagulante e decréscimo na fibrinólise, os quais, se não controlados, conduzem à deterioração funcional progressiva de múltiplos órgãos interdependentes (BASSO et al., 2008).

Figura 7 - Curva de sobrevida dos grupos SHAM e CLP

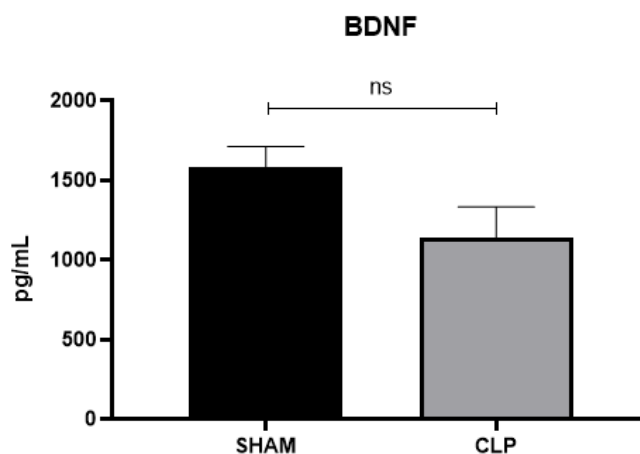


Avaliação da mortalidade dos camundongos C57BL/6 submetidos à CLP. Animais do grupo controle submetido a cirurgia branca (SHAM) (n= 27) e animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco (CLP) (n= 49). A análise estatística foi avaliada pelo teste de Log-rank. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. *** $p=0,0007$.

5.2 Avaliação da concentração de BDNF no hipocampo

A avaliação da concentração de BDNF no hipocampo revela que não houve diferenças significativas entre o grupo submetido à cirurgia CLP e o grupo de controle SHAM (SHAM vs. CLP $p > 0,05$), apesar de observarmos uma tendência na redução de BDNF no grupo submetido a CLP (Fig. 8).

Figura 8 - Avaliação das concentrações de BDNF hipocampal



Animais do grupo controle submetido a cirurgia branca (SHAM) (n= 6) e animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco (CLP) (n= 6). Os dados foram avaliados pelo teste *T de Student* e expressos como *média ± erro padrão da média*. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. ns= Não significativo.

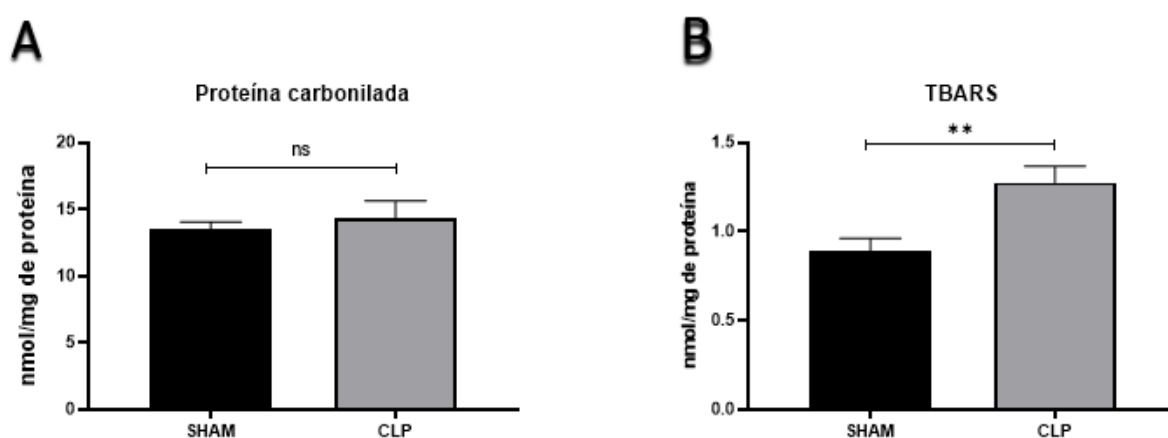
O BDNF desempenha papel essencial na promoção da manutenção, neurogênese, crescimento e sobrevivência dos neurônios, pois suporta a plasticidade e a função neuronal, interferindo em vários processos celulares como a conectividade neuronal, transmissão sináptica e crescimento dendrítico. Ademais, apresenta propriedades neuroprotetoras, além de modular reações neuronais a lesões e estresse (SHAN et al., 2021). Com a neurogênese, o BDNF colabora com a plasticidade, a adaptabilidade do cérebro em desenvolvimento, além de ter papel fundamental na formação da memória. A neuroinflamação pode prejudicar o funcionamento dos neurotransmissores no cérebro, prejudicar a transmissão sináptica e contribuir para a disfunção neuronal. Também ativa vias de sinalização que induzem a expressão de enzimas que geram ERO's, contribuindo para o estresse oxidativo (BOUVIER et al., 2016). O estresse oxidativo, por outro lado, pode causar a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA nas células neuronais, trazendo transtornos ainda maiores na sua função e viabilidade. A combinação de neuroinflamação e estresse oxidativo pode formar um ciclo prejudicial no cérebro de animais com sepse, causando lesões cerebrais progressivas e comprometimento cognitivo (JIANG et al., 2022). Desse modo, é observado que a desregulação do BDNF é influenciada diretamente por fatores como o estresse oxidativo, a neuroinflamação e a resposta inflamatória sistêmica. Nossos resultados demonstraram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo SHAM e o CLP. Uma explicação para esse resultado pode ser o tempo em que foi

dosado o BDNF (5 dias após CLP). A dosagem do BDNF foi realizada 5 dias após a CLP, sugerindo que nesse tempo já tenha havido certa resolução da inflamação e do estresse oxidativo. No estudo, de Della e colaboradores (2018), achados semelhantes foram visualizados também 10 dias após a cirurgia de CLP em camundongos machos Wistar, onde não foi observado diferenças significativas nos níveis de BDNF no hipocampo entre o grupo CLP e o grupo SHAM.

5.3 Avaliação dos biomarcadores de dano oxidativo cerebral

Nossos resultados revelam que não houve diferenças significativas nas concentrações de proteína carbonilada do grupo CLP comparado ao grupo SHAM (SHAM vs. CLP $p > 0,05$). Já em relação a concentração do biomarcador TBARS, houve um aumento desse biomarcador no grupo CLP em comparação ao grupo SHAM (SHAM vs. CLP $p = 0,0046$) (Fig. 9)

Figura 9 - Avaliação dos biomarcadores de dano oxidativo cerebral



(A) concentração de Proteína Carbonilada no córtex cerebral; (B) concentração de TBARS no córtex cerebral; Animais do grupo controle submetido a cirurgia branca (SHAM) ($n= 6$ na avaliação da Proteína Carbonilada) ($n= 10$ no TBARS) e animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco (CLP) ($n= 7$ na avaliação da Proteína Carbonilada) ($n= 7$ no TBARS). Os dados foram avaliados pelo teste *T de Student* e expressos como *média ± erro padrão da média*. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. ** $p= 0,005$. ns= Não significativo.

Em relação ao biomarcador de dano oxidativo proteína carbonilada resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Novochadlo et al. (2021) onde ratos Wistar machos adultos foram submetidos a CLP e também não foi encontrado diferença significativa nas concentrações de proteína carbonilada no cérebro dos animais

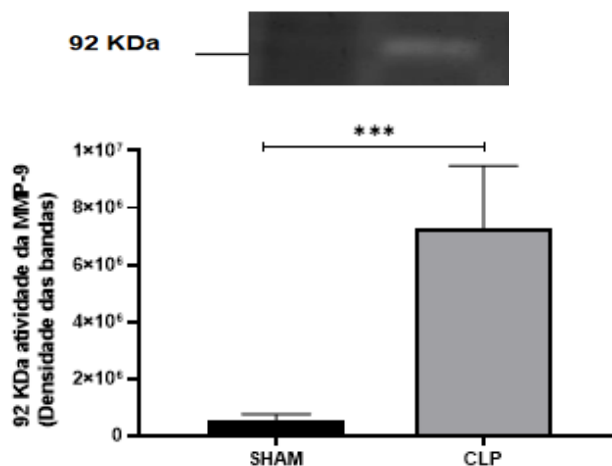
submetidos a cirurgia SHAM e CLP. Esse resultado pode ser justificado pela variação da magnitude da resposta inflamatória na CLP, ao controle de variáveis experimentais como temperatura, umidade, manipulação pré e pós operatória que podem afetar a resposta biológica ao procedimento cirúrgico (PIZZOL, 2013).

A peroxidação lipídica é um dano oxidativo aos lipídeos que causa perda das funções da membrana e seus produtos finais podem ser reativos e induzir danos a outras moléculas (MARGOTTI et al., 2021). O método de TBARS (Substância reativa do Ácido Tiobarbitúrico) é utilizado para medir tanto os produtos finais de peroxidação lipídica, sendo um importante biomarcador de estresse oxidativo na sepse (ARNHOLD et al., 2014). Resultado semelhante foi observado no estudo de Catalão e colaboradores (2016), onde eles observaram um aumento de TBARS no cérebro de ratos Wistar submetidos à CLP. Essa situação pode ter sido oriunda do acúmulo de ERO's e radicais livres. A maioria desses radicais é produzida nas mitocôndrias durante o processo de fosforilação oxidativa, podendo difundir-se no citosol e causar danos extramitocondriais (NEWTON et al., 2015). Os neurônios humanos contêm um grande número de mitocôndrias para suprir a demanda de oxigênio. Isto significa uma alta dependência da eficiência mitocondrial. Porém, pode ocorrer um vazamento da cadeia de transporte de elétrons e gerar as EROs que, por sua vez, podem danificar a mitocôndria. Essa mitocôndria lesada apresenta maior vazamento de elétrons e, como efeito, produz mais EROs, gerando um ciclo vicioso (BARBOSA et al., 2006). Além disso, os lipídios das membranas neuronais contêm ácidos graxos altamente insaturados que são extremamente susceptíveis à peroxidação. Desse modo, o estresse oxidativo interfere severamente na função lipídica neural causando a formação de subprodutos que podem danificar as proteínas de membrana, gerar um ciclo peroxidativo e afetar a permeabilidade e fluidez da membrana (ALVES, 2018). Em nosso trabalho, o TBARS foi um indicador dessa alteração (GOLDIM, 2018).

5.4 Atividade da MMP-9 no córtex cerebral

No que se refere a atividade da MMP-9 no cérebro, foi observado que houve um aumento na atividade da MMP9 no grupo CLP em comparação com o grupo de controle SHAM (SHAM vs. CLP $p = 0,0152$) (Fig. 10).

Figura 10 - Atividade da MMP-9 no córtex cerebral



Atividade da MMP-9 no córtex cerebral. Animais do grupo controle submetido a cirurgia branca (SHAM) (n= 7) e animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco (CLP) (n= 8). Os dados foram avaliados pelo teste *T de Student* e expressos como *média ± erro padrão da média*. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. *** $p = 0,0001$.

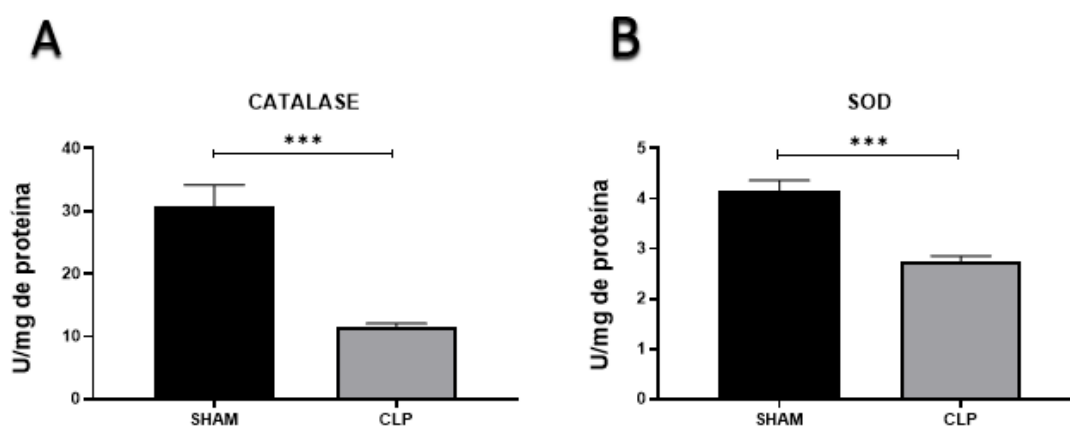
Resultados similares ao nosso foi encontrado no trabalho de Pizzol et al. (2013), onde ratos Wistar machos foram induzidos à sepse pelo modelo CLP e houve um aumento da MMP-9 em camundongos sépticos. Outro estudo que também apresentou resultados semelhantes foi o de Yang e colaboradores (2022), em que foram utilizados ratos Sprague-Dawley machos também submetidos a sepse pelo modelo CLP. As MMP's extracelular são enzimas proteolíticas dependentes de zinco que são encontradas comumente em sua forma inativa. Um dos mecanismos que controlam a expressão gênica das MMPs são as ERO's que, ao se ligarem a receptores na superfície da célula promovem uma cascata de sinalização intracelular e ativam fatores de transcrição, que se ligam a regiões responsivas presentes no promotor de genes para diferentes MMPs. Contudo, as MMPs se encontram inativas no citosol e podem ser clivadas por proteases, como a plasmina, o ativador do plasminogênio tecidual (tPA) ou outras MMP ao seu estado ativo (ROJAS et al., 2011). A BHE é uma estrutura que protege o cérebro e o SNC de substâncias potencialmente prejudiciais presentes no sangue. Composta principalmente por células endoteliais que revestem os capilares cerebrais, ela forma junções apertadas, criando uma barreira física e seletivamente permeável. Esta barreira regula a entrada de moléculas e células sanguíneas no cérebro, garantindo que apenas substâncias específicas, como nutrientes essenciais, atravessem (BARICHELLO et al., 2020). A BHE é essencial para a homeostase cerebral, protegendo o cérebro das alterações no

ambiente circulante e patógenos. A disfunção da BHE está vinculada à exposição do microambiente cerebral a substâncias potencialmente prejudiciais, o que pode resultar na perda da homeostase, interferência na sinalização neuronal e, em última instância, na morte celular. Em situações de sepse, MMP-9 são hiperativadas, e, apenas 24 horas após o início do quadro séptico, podem desfazer as junções entre as células endoteliais da BHE, promovendo uma notável alteração na permeabilidade dessa barreira (BARICHELLO et al., 2020). A partir dessa disfunção na BHE, há uma invasão de células do sistema imunológico, a passagem de substâncias tóxicas e a ativação de células gliais, especialmente a microglia. Isso desencadeia uma resposta neuroimune mais intensa, estimulando o surgimento de estresse oxidativo e uma reação inflamatória local. Como resultado imediato, observa-se dano neuronal, que, em curto prazo, causa alterações nos sistemas neuroendócrino, autonômico e comportamental. Essas alterações têm repercussões a longo prazo, manifestando-se como déficits cognitivos, incluindo problemas de memória, concentração e uma possível perda geral da função cognitiva. Além disso, ao longo do tempo, essas mudanças estão associadas a problemas psiquiátricos, como ansiedade e depressão (DELLA GIUSTINA, 2018).

5.5 Avaliação do perfil antioxidante cerebral

Foi observado uma diminuição significativa na atividade da SOD (SHAM vs. CLP $p = 0,0001$) e CAT (SHAM vs. CLP $p = 0,0003$) no cérebro dos animais submetidos a CLP (Fig. 11).

Figura 11 - Avaliação do perfil antioxidante cerebral



(A) atividade da SOD no córtex cerebral; (B) atividade da CAT no córtex cerebral; Animais do grupo controle submetido a cirurgia branca (SHAM) (n= 7 na atividade da SOD) (n= 6 na atividade da CAT) e animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco (CLP) (n = 6 na SOD) (n= 6 na CAT). Os dados foram avaliados pelo teste *T de Student* e expressos como *média ± erro padrão da média*. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. ** $p = 0,005$ *** $p = 0,0001$.

Resultados similares ao nosso trabalho foram encontrados no estudo de Zarbato e colaboradores (2018), que utilizaram ratos Wistar machos e adultos e também obtiveram em seus resultados uma diminuição das enzimas SOD e CAT nos animais submetidos a CLP.

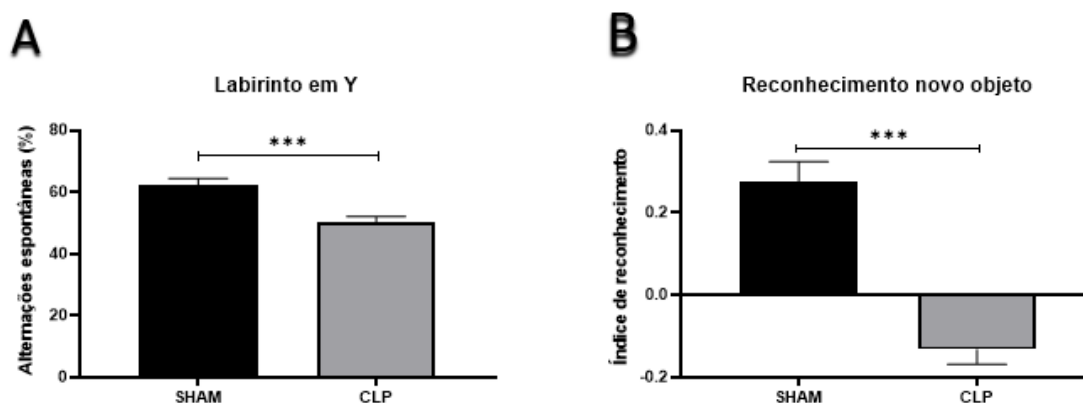
Para defender o organismo do efeito das EROs na sepse, o organismo conta com as enzimas antioxidantes SOD e CAT. A SOD converte o superóxido em H_2O_2 e a CAT é uma heme-enzima localizada predominantemente em peroxissomos, onde catalisa a decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio molecular. A diminuição desses antioxidantes durante a sepse está relacionada ao desequilíbrio entre a produção de ERO's e a capacidade do organismo em neutralizá-las. A sepse é caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica intensa, resultando em uma produção excessiva dessas espécies reativas, incluindo o ânion superóxido. Esse aumento na produção de EROs pode levar a um consumo acelerado de antioxidantes, como SOD e CAT, que normalmente agem para neutralizar essas espécies reativas (RITTER et al., 2007). Além disso, fatores pró-inflamatórios associados à sepse podem inibir as enzimas antioxidantes, interferindo nas vias de sinalização que regulam sua expressão e atividade. A disfunção mitocondrial, lesão de órgãos e tecidos, e o estresse oxidativo sistêmico observados na sepse também contribuem para a diminuição dos antioxidantes, exacerbando o desequilíbrio oxidativo que pode impactar negativamente a saúde celular e o funcionamento dos órgãos (ANDRADES, 2006).

5.6 Avaliação dos testes cognitivos de memória

Para avaliar se a indução da sepse afetou o desempenho cognitivo dos animais foram realizados os testes cognitivos de Labirinto em Y e reconhecimento de novo objeto. A análise dos resultados revela que os animais submetidos à cirurgia CLP apresentaram um declínio significativo no desempenho cognitivo tanto no teste

de labirinto em Y (SHAM vs. CLP $p = 0,009$), quanto no teste de reconhecimento de um novo objeto (SHAM vs. CLP $p < 0,0001$) (Fig. 12).

Figura 12 - Análise dos testes cognitivos de memória



(A) Efeito da cirurgia CLP na cognição dos animais no teste de labirinto em Y; (B) Efeito da cirurgia CLP na cognição dos animais no teste de reconhecimento do novo objeto; Animais do grupo controle submetido a cirurgia branca (SHAM) ($n = 10$ no teste de labirinto em Y) ($n = 13$ no teste de reconhecimento do novo objeto) e animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco (CLP) ($n = 14$ no teste de labirinto em Y) ($n = 15$ no teste de reconhecimento do novo objeto). Os dados foram avaliados pelo teste *T de Student* e expressos como *média \pm erro padrão da média*. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. *** $p = 0,0001$.

Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Xie et al., (2020) onde camundongos C57BL/6 machos foram submetidos a cirurgia SHAM e CLP e também se observou um declínio da cognição nos testes cognitivos no grupo CLP em relação ao SHAM.

Na condição de sepse, o organismo busca combater o processo infeccioso; no entanto, essa resposta é exacerbada. Nesse contexto, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, destinadas a combater o patógeno, recrutar células do sistema imunológico e iniciar a resposta de defesa. Adicionalmente, a ativação do sistema imunológico desencadeia a mobilização de células específicas, como macrófagos e neutrófilos, que iniciam a produção de EROs como parte de sua função no combate a patógenos. (MACHADO, 2004). No entanto, em casos de sepse, a resposta inflamatória pode se tornar desregulada, resultando em uma produção excessiva e prolongada de EROs. Esse desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos antioxidantes de defesa do organismo leva ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo é prejudicial porque as EROs, quando presentes em quantidades excessivas, podem causar danos às células, afetando lipídios, proteínas e DNA. Esse dano celular contribui para a disfunção de órgãos e tecidos observada na sepse, como o cérebro. Além disso, as MMP9 podem ser ativadas tanto pelas EROs, quanto pela indução da

expressão e ativação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a interleucina-1 beta (IL-1 β) (MARGOTTI, 2021). As MMP9 podem desfazer as junções entre as células endoteliais da BHE, aumentando sua permeabilidade e permitindo que tanto as ERO's, quanto as citocinas inflamatórias cheguem ao cérebro, agravando a inflamação e o estresse oxidativo no ambiente neural (BARICHELLO et al., 2018). A combinação de inflamação, estresse oxidativo e alterações na BHE pode resultar em dano neuronal direto (PERUZOLLO, 2022). Os neurônios podem sofrer apoptose, comprometendo a síntese e liberação dos neurotransmissores. Isso, por sua vez, afeta a comunicação e a sinapse entre os neurônios. Além disso, devido ao comprometimento da plasticidade, há um impacto direto nas funções cognitivas, como memória, aprendizagem e adaptação do indivíduo. (ENCINAS, 2019).

Quadro 1: Resumo dos resultados

Parâmetro avaliado	Grupo CLP em relação ao grupo SHAM
Mortalidade	Aumentou
Testes cognitivos de memória	Comprometimento cognitivo
BDNF hipocampal	Sem alteração nas concentrações de BDNF
Biomarcadores de dano oxidativo cerebral	Aumento de TBARS Sem alteração na proteína carbonilada
Atividade da MMP9	Aumento na atividade da MMP9
Avaliação do perfil antioxidante cerebral	Diminuição da atividade de SOD e CAT

6 CONCLUSÃO

Sendo assim, nosso trabalho mostrou que a indução da sepse por CLP induziu estresse oxidativo cerebral, o que pode ter contribuído para diminuição do desempenho cognitivo dos animais sépticos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, N. R. C. DE et al. Análise de tendência de mortalidade por sepse no Brasil e por regiões de 2010 a 2019. **Revista de Saúde Pública**, v. 56, p. 25, 22 abr. 2022.

ALVES, D. V. DE S. **Efeitos do óleo de coco e/ou do ambiente enriquecido sobre a excitabilidade cerebral e a peroxidação lipídica em ratos nutridos e hipernutridos durante o aleitamento**. 2018. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2018.

ANDRADES, M. E. **Importância da atividade de enzimas antioxidantes na progressão da severidade da sepse**. 2006. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303–1310, jul. 2001.

ARNHOLD, A. L.; HECK, T. G. **MÉTODO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS), E SUA IMPORTÂNCIA PARA A AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM DIVERSAS APLICAÇÕES**. Salão do Conhecimento, 11 ago. 2014.

BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G. DE; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352–1360, dez. 2006.

BARICHELLO, T. et al. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis*. **Critical Care Medicine**, v. 35, n. 9, p. 2186–2190, set. 2007.

Barone E, Di Domenico F, Butterfield DA. “Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer disease: their pleiotropic functions as potential therapeutic targets”. *Biochem Pharmacol*. 88(4):605-16, 2014.

BARRETO, M. F. C. et al. Sepsis in a university hospital: a prospective study for the cost analysis of patients' hospitalization. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 50, n. 2, p. 302–308, abr. 2016.

BAZZARI, A. H.; BAZZARI, F. H. BDNF Therapeutic Mechanisms in Neuropsychiatric Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8417, 29 jul. 2022.

BIFF, D. et al. **Correlation of Acute Phase Inflammatory and Oxidative Markers With Long-term Cognitive Impairment in Sepsis Survivors Rats**. *Shock*, v. 40, n. 1, p. 45–48, jul. 2013.

BOUVIER, D. S. et al. High Resolution Dissection of Reactive Glial Nets in Alzheimer's Disease. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24544, 19 abr. 2016.

CATALÃO, Carlos Henrique Rocha; SANTOS-JÔNIO, Nilton Nascimento; COSTA, Luís Henrique Angenendt da; SOUZA, Anderson Oliveira; ALBERICI, Luciane Carla; ROCHA, Maria José Alves. **Brain Oxidative Stress During Experimental Sepsis Is Attenuated by Simvastatin Administration.** *Molecular Neurobiology*, [S.L.], v. 54, n. 9, p. 7008-7018, 28 out. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0218-3>.

COBB, C. A.; COLE, M. P. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. **Neurobiology of Disease**, v. 84, p. 4–21, dez. 2015.

COMIM CM, et al. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res*. 2011 Feb;36(2):304-11. doi: 10.1007/s11064-010-0320-2. **Epub** 2010 Nov 25. PMID: 21107688.

Como recuperar a memória e cognição pós-sepse? - Reabilita Sepse. Disponível em: <<https://reabilitasepse.com.br/recuperar-memoria-cognicao-pos-sepse/>>. Acesso em: 13 nov. 2023.

CORRÊA, G. F.; Zapparoli, A. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol. IX (3), 67 - 72, 2012.

CRUZ-RODRÍGUEZ, J. et al. Papel del estrés oxidativo en el desarrollo del deterioro cognitivo y su progresión a enfermedad de Alzheimer. **Revista de Ciencias de la Salud**, p. 14–22, 19 set. 2019.

DAL-PIZZOL, F. et al. **Matrix Metalloproteinase-2 and Metalloproteinase-9 Activities are Associated with Blood–Brain Barrier Dysfunction in an Animal Model of Severe Sepsis.** *Molecular Neurobiology*, v. 48, n. 1, p. 62–70, 12 mar. 2013.

DEJAGER, L. et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198–208, 1 abr. 2011.

DELLA GIUSTINA, Amanda. **ESTUDO PRÉ-CLÍNICO COM UTILIZAÇÃO DE NUTRACÊUTICOS SOBRE A DISFUNÇÃO CEREBRAL NA SEPSE.** 2018. 156 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação, Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2018.

DELLA GIUSTINA, Amanda; GOLDIM, Mariana Pereira; DANIELSKI, Lucinéia Gainski; FLORENTINO, Drielly; MATHIAS, Khiany; GARBOSSA, Leandro; OLIVEIRA JUNIOR, Aloir Neri; FILETI, Maria Eduarda; ZARBATO, Graciela Freitas; ROSA, Naiana da. Alpha-lipoic acid attenuates acute neuroinflammation and long-term cognitive impairment after polymicrobial sepsis. **Neurochemistry International**, [S.L.], v. 108, p. 436-447, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2017.06.003>.

Ebong, S., Call, D., Nemzek, J., Bolgos, G., Newcomb, D., & Remick, D. **Alterações imunopatológicas em modelos murinos de sepse de gravidade crescente.** *Infection and Immunity*, volume 67, número 12, páginas 6603-6610, dezembro de

1999. DOI: 10.1128/iai.67.12.6603-6610.1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC97073/>

EJDER SAYLAV BORA. Sepsis and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF): Exploring the Complex Connection. **Biochemistry**, 21 set. 2023. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/87399>. Acesso em: 15 nov. 2023.

ENCINAS, Andressa Manfredini Soliz. **O PAPEL DA DINÂMICA MITOCONDRIAL NA DISFUNÇÃO COGNITIVA EM ANIMAIS SOBREVIVENTES A SEPSE**. 2019. 96 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Bioquímica, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, 2019.

FAGOTTI CORRÊA, G.; ZAPPAROLI, A. MODELO EXPERIMENTAL EM ROEDORES - LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 3, 30 set. 2012.

GARRIDO, Alejandra G. *et al.* Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. **Acta Cirurgica Brasileira**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 82-88, abr. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502004000200001>.

GOLDIM, Mariana Pereira de Souza *et al.* **ESTUDO DO COMPORTAMENTO DOENTIO NA SEPSE EXPERIMENTAL E O ENVOLVIMENTO DA DISFUNÇÃO CEREBRAL E ATIVAÇÃO MICROGLIAL**. 2018. 122 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2018.

HOOGLAND, IC, Houbolt, C., van Westerloo, DJ *et al.* Inflamação sistêmica e ativação microglial: revisão sistemática de experimentos com animais. **J Neuroinflammation** 12, 114 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0332-6>

JIANG, L. *et al.* Inhibition of the integrated stress response reverses oxidative stress damage-induced postoperative cognitive dysfunction. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 16, 21 set. 2022.

JÚNIOR, J. G. S. DE L. *et al.* CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA SEPSE NAS UNIDADES DE SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 2018 E 2021: IMPACTO DA PANDEMIA DE COVID-19. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 102090, 1 jan. 2022.

KOWIAŃSKI P, Lietzau *et al.* BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. **Cell Mol Neurobiol**. 2018 Apr;38(3):579-593. doi: 10.1007/s10571-017-0510-4. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28623429; PMCID: PMC5835061.

KURTZ, Pedro Martins Pereira. **ENCEFALOPATIA ASSOCIADA A SEPSE: FISIOPATOLOGIA NA SEPSE EXPERIMENTAL COM AVALIAÇÃO POR MONITORIZAÇÃO MULTIMODAL e ESTUDO OBSERVACIONAL NA SEPSE CLÍNICA (ESTUDO SAE)**. 2016. 104 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pósgraduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2016.

LEMAY, A. C. et al. Predictors of Long-term Mortality After Severe Sepsis in the Elderly. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 347, n. 4, p. 282–288, abr. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23689053/>. Acesso em: 17 nov. 2023.

LOBO, S.; REZENDE, E. **Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: the Brazilian ICUs project**. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, jan. 31DC. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbti/a/XD867yzfcJGNpnMKhQg8wyb/?lang=en#>. Acesso em: 08 jan. 2023.

LOUREIRO, Júlia Maria Peixoto. **EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM VITAMINA E NA SEPSE EXPERIMENTAL E SUA SEQUELA AVERSIVA**. 2020. 80 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

LUBIS, B. et al. The Effect of Thiamine, Ascorbic Acid, and the Combination of Them on the Levels of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 (TIMP-1) in Sepsis Patients. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 15, p. 5741–5751, set. 2022.

MACHADO, Flavia R; CAVALCANTI, Alexandre Biasi; BOZZA, Fernando Augusto; FERREIRA, Elaine M; CARRARA, Fernanda Sousa Angotti; SOUSA, Juliana Lubarino; CAIXETA, Noemi; SALOMAO, Reinaldo; ANGUS, Derek C; AZEVEDO, Luciano Cesar Pontes. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 1180-1189, nov. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30322-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30322-5). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(17\)30322-5/abstract#](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(17)30322-5/abstract#). Acesso em: 11 fev. 2024.

MARGOTTI, Willan. **ESTRESSE OXIDATIVO EM MÚLTIPLOS ÓRGÃOS EM RATOS VELHOS APÓS SEPSE: UM ESTUDO PRÉ-CLÍNICO**. 2021. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Bioquímica, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2021.

MATEJA MANČEK-KEBER; JERALA, R. **Postulates for validating TLR4 agonists**. v. 45, n. 2, p. 356–370, 15 jan. 2015.

NEWTON, D. F.; NAIBERG, M. R.; GOLDSTEIN, B. I. Oxidative stress and cognition amongst adults without dementia or stroke: Implications for mechanistic and therapeutic research in psychiatric disorders. **Psychiatry Research**, v. 227, n. 2-3, p. 127–134, jun. 2015.

NOVOCHADLO, Michele; GOLDIM, Mariana Pereira; BONFANTE, Sandra; JOAQUIM, Larissa; MATHIAS, Khiany; METZKER, Kiuanne; MACHADO, Richard Simon; LANZZARIN, Everton; BERNADES, Gabriela; BAGIO, Erick. **Folic acid alleviates the blood brain barrier permeability and oxidative stress and prevents cognitive decline in sepsis-surviving rats**. *Microvascular Research*, [S.L.], v. 137, p. 104193, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2021.104193>.

NWAFOR DC, Brichacek AL, Mohammad AS et al. Targeting the Blood-Brain Barrier to **Prevent Sepsis-Associated Cognitive Impairment**. *J Cent Nerv Syst Dis*. 2019 Apr 9;11:1179573519840652. doi: 10.1177/1179573519840652. PMID: 31007531; PMCID: PMC6456845.

OISETH, Stanley; JONES, Lindsay; MAZA, Evelin. A Célula: Junções Celulares. *In: OISETH, Stanley et al. A Célula: Junções Celulares*. [S. l.], 9 jun. 2022. Disponível em: <https://www.lecturio.com/pt/concepts/la-celula-juncoes-celulares/>. Acesso em: 7 jan. 2024.

OUMORÉ. **A Biologia do Envelhecimento**. **OUMORÉ**, 11 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.oumere.com/blogs/news/the-biology-of-aging>>. Acesso em: nov. 20. 2023.

PASCHOAL, Giselle Mota dos Santos. **Sepse e Choque Séptico: Aspectos Fisiopatológicos e a Importância do Glicocálix**. 2019. 23 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Gama, 2019.

PATEL, A. M.; PERIASAMY, H.; MOKALE, S. N. Immunomodulatory dose of clindamycin in combination with ceftriaxone improves survival and prevents organ damage in murine polymicrobial sepsis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 9, p. 1671–1679, 7 maio 2020.

PAULA SIENES BAILO et al. **Implicación del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas y posibles terapias antioxidantes**. v. 3, n. 4, p. 351–360, 22 dez. 2022.

PEREZ-HEYDRICH, C. et al. Assessing effects of cholera vaccination in the presence of interference. **Biometrics**, v. 70, n. 3, p. 731–741, 20 maio 2014.

PERUZZOLO, Tatiana Lauxen. **MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NO TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO**. 2022. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022.

PROCEDIMENTO DE PUNÇÃO CECAL LIGADURA. *Diário Jove*, 7 maio 2011. Disponível em: <https://www.jove.com/t/2860/cecal-ligation-puncture-procedure?language=Portuguese>. Acesso em: 10 out. 2023.

RADDATZ, B. **Sepse: sintomas, diagnóstico, fatores de risco e tratamento**. *Hilab*, fev. 3DC. Disponível em: <<https://hilab.com.br/blog/sepse/>>. Acesso em: nov. 15, 2023.

REMPE RG, Hartz AMS, Bauer B. **Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers**. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016 Sep;36(9):1481-507. doi: 10.1177/0271678X16655551. **Epub** 2016 Jun 20. PMID: 27323783; PMCID: PMC5012524.

RINGLAND, C. et al. MMP9 modulation improves specific neurobehavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **BMC Neuroscience**, v. 22, n. 1, 25 maio 2021.

RODRIGUES, Judite Filgueiras. **SENSIBILIDADE À ENCEFALOPATIA ASSOCIADA À SEPSE: COMPARAÇÃO ENTRE ANIMAIS SEDENTÁRIOS E NÃO SEDENTÁRIOS**. 2017. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2017.

ROJAS, H.; RITTER, C.; PIZZOL, F. D. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, p. 222–227, 1 jun. 2011.

ROMA, P. C. F. Sepsis e choque séptico na UTI: avaliação da qualidade de vida após a alta hospitalar. **COORTE - Revista Científica do Hospital Santa Rosa**, n. 14, 18 dez. 2022.

SANTOS, T. B. DOS et al. Associação entre o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o transtorno depressivo: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e461101019139, 15 ago. 2021.

SHRUM, B., Anantha, RV, Xu, SX et al. Um sistema de pontuação robusto para avaliar a gravidade da sepsis em um modelo animal. **BMC Res Notes** 7, 233 (2014). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-233>

SILVA, Eliézer *et al.* Sepsis, um problema do tamanho do Brasil. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 5-6, mar. 2006. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-507x2006000100001>.

SOUSA, Virginia Luiz de. **MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO PREJUÍZO COGNITIVO TARDIO EM MODELO DE SEPSE EM CAMUNDONGOS**. 2019. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Farmácia, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

SPREAD - ILAS (São Paulo) (org.). **SPREAD – Sepsis Prevalence Assessment Database**. 2022. ILAS – Instituto Latino Americano de Sepsis. Disponível em: <https://ilas.org.br/spread/>. Acesso em: 6 out. 2023.

SULZBACHER, M. M.; LUDWIG, M. S.; HECK, T. G. Oxidative stress and decreased tissue HSP70 are involved in the genesis of sepsis: HSP70 as a therapeutic target. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 32, n. 4, 2020.

SWEENEY, M., Sagare, A. & Zlokovic, B. quebra da barreira hematoencefálica na doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas. **Nat Rev Neurol** 14, 133–150 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188>

SZAFLARSKI, J. P. et al. White Matter Abnormalities in Patients with Treatment-Resistant Genetic Generalized Epilepsies. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 1966–1975, 10 jun. 2016. **The Biology of Aging**. Disponível em:

<<https://www.oumere.com/blogs/news/the-biology-of-aging>>. Acesso em: 10 dez. 2023.

XIE, Keliang; WANG, Yaoqi; YIN, Lijun; WANG, Yuzun; CHEN, Hongguang; MAO, Xing; WANG, Guolin. **Hydrogen Gas Alleviates Sepsis-Induced Brain Injury by Improving Mitochondrial Biogenesis Through the Activation of PGC- α in Mice.** *Shock*, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 100-109, 23 jun. 2020. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/shk.0000000000001594>.

YANG C, Hawkins KE, Doré S, Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019 Feb 1;316(2):C135-C153. doi: 10.1152/ajpcell.00136.2018. **Epub** 2018 Oct 31. PMID: 30379577; PMCID: PMC6397344.

YANG, G. et al. Minocycline Pretreatment Prevents Blood-Brain Barrier Disruption in Septic Rats. **The Journal of Surgical Research**, v. 273, p. 247–254, 1 maio 2022.
ZARBATO, G. F. et al. Dimethyl Fumarate Limits Neuroinflammation and Oxidative Stress and Improves Cognitive Impairment After Polymicrobial Sepsis. **Neurotoxicity Research**, v. 34, n. 3, p. 418–430, 30 abr. 2018.

ZARBOCK, A.; GOMEZ, H.; KELLUM, J. A. Sepsis-induced acute kidney injury revisited. **Current Opinion in Critical Care**, v. 20, n. 6, p. 588–595, dez. 2014.