



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Kelly Cattelan Bonorino

**PNEUMOSEPSE INDUZIDA POR *Klebsiella pneumoniae* EM CAMUNDONGOS:  
CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E PERFIL NEUROINFLAMATÓRIO**

Florianópolis

2021

Kelly Cattelan Bonorino

**PNEUMOSEPSE INDUZIDA POR *Klebsiella pneumoniae* EM CAMUNDONGOS:  
CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E PERFIL NEUROINFLAMATÓRIO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Neurociências da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do título de  
Doutora em Neurociências  
Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos  
Santos  
Coorientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Deborah Camargo  
Hizume Kunzler

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cattelan Bonorino, Kelly

Pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* em camundongos: caracterização comportamental e perfil neuroinflamatório / Kelly Cattelan Bonorino ; orientador, Adair Roberto Soares dos Santos, coorientador, Deborah Camargo Hizume Kunzler, 2021.

120 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Sepse. 3. Comportamento. 4. Inflamação. 5. Citocinas. I. Soares dos Santos, Adair Roberto . II. Camargo Hizume Kunzler, Deborah. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Neurociências. IV. Título.

Kelly Cattelan Bonorino

**Pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* em camundongos: caracterização comportamental e perfil neuroinflamatório**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.  
Instituição UFSC

Prof. Jamil Assreuy Filho Dr.  
Instituição UFSC

Prof.<sup>a</sup> Patrícia Rieken Macedo Rocco Dra.  
Instituição UFRJ

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Neurociências.

---

Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Adair Roberto Soares dos Santos, Dr.  
Orientador (*in memoriam*)

Florianópolis, 2021.



Este trabalho é dedicado ao querido  
Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (*in memoriam*)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me dar força e luz para alcançar meus objetivos.

Sou grata a minha família, meu bem precioso!

Minha mãe, Élide, meu porto seguro, meu exemplo e força maior, minha amiga, e um ser lindo, com coração grandioso... Que sempre esteve comigo em todas as jornadas de minha vida! Obrigada por todo amor, ensinamentos, dedicação, atenção e carinho!

Ao meu irmão, Rodo pelo amor, ensinamentos, pela parceria, amizade, cumplicidade e por me ensinar a ver a vida de forma mais leve e divertida.

À minha “amiga irmã”, Rosa, uma pessoa única e linda, que caminha ao meu lado desde sempre, que compartilha ensinamentos para a vida, por todo teu amor, carinho e estímulo!

Obrigada por acreditarem em mim e nos meus sonhos e por me ensinarem a seguir minhas metas sempre com perseverança e coragem. Sem vocês, nada seria possível.

Agradeço ao meu querido e grande professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, que abriu as portas do seu laboratório e dedicou-se a me orientar por todos esses anos de doutorado, com muita alegria e generosidade. Obtive grandes aprendizados acadêmicos, científicos e de vida! Realmente um professor inspirador, que deixou um lindo legado para a ciência, para seus amigos e seus alunos.

À professora Dra. Deborah Hizume Kunzler que despertou em mim o interesse e amor pela pesquisa experimental, mostrando-me a importância da pesquisa básica. Profissional excepcional, pessoa exemplar e amiga para todas as horas. Obrigada pela orientação, por todos os ensinamentos, por todo empenho, paciência e confiança.

À professora Dra. Morgana Duarte, que mesmo pelo pouco tempo de convivência no laboratório, conquistou minha grande admiração, pela sua bondade, força, determinação e inteligência.

Ao Prof. Jamil pela generosidade e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos sobre o modelo de sepsis e abrir as portas do Laboratório de Óxido Nítrico (NOLab).

À Prof. Regina e ao doutorando Filipe por auxiliarem em análises de MPO e colaborarem com esse trabalho.

Aos membros da banca que se disponibilizaram a avaliar e contribuir para esse trabalho.

À UFSC, ao PPG Neurociências e aos professores que nos inspiram e nos motivam, obrigada pelos valiosos aprendizados e por contribuir na minha formação!

Aos colegas e amigos do Laboratório (LANDI, UFSC), Scheila, Cibelle, Jheni, Tassi, Marcos, Carol, Jeane, Jhonatan, Shelly e Simone, pelo companheirismo, pela convivência e aprendizado, pelos cafês, pelos rolês e discussões sobre projetos e sobre a vida!

Sou eternamente grata por ter conhecido as amigas maravilhosas Tayza, Scheila, Cibelle e Carol - da UFSC para a vida! Agradeço e me sinto honrada em poder conviver e aprender sempre com vocês!

Um agradecimento especial à um dos maiores presentes que a Neuro me proporcionou, a amiga Scheila, um ser humano incrível e profissional/pesquisadora exemplar para mim, agradeço por ter contribuído diretamente neste trabalho, por não medir esforços em auxiliar, em acreditar e me incentivar em todos os momentos!

Aos membros e queridos amigos do LAPEX/ UDESC... Débora, Gi, Alice, Jessy, Gui, Isa, Vitória. Obrigada pela convivência, risadas, compartilhamento de conhecimentos e de experiências!

Agradeço à Aglaes, obrigada por acreditar nessa jornada, e por toda paciência, amor, carinho, apoio e incentivo!!

Agradeço aos meus colegas e amigos do HU que sempre acreditaram, apoiaram e me ajudaram de maneira carinhosa nesta caminhada, especialmente as amigas Juliana, Roberta, Alê, Mari, Carol e Nayala.

Às minhas amigas, de todas as horas e momentos Saiuri, Huber, Raquel e Márcia por me incentivarem, torcerem por mim e entenderem meus momentos de “ausência”.

Agradeço às minhas “eternas residentes” que moram no meu coração e na minha vida... Fernanda e Nair pelo apoio e carinho de sempre!

Agradeço à Katerine, pela linda amizade, cumplicidade, pelos ensinamentos e por compartilharmos e realizarmos nossos “sonhos e perrengues” sempre apoiando uma à outra.

Ao meu primo, Dr. Leandro Cattelan Souza, meu exemplo, de pesquisador, professor e que me incentivou a encarar essa jornada, e por inúmeras vezes me ensinou e auxiliou com paciência, principalmente no começo desse ciclo!

Ao CIEnP, pelo apoio e colaboração em análises do perfil hematológico.

Ao LAMEB pelo auxílio e disponibilidade de equipamentos utilizados neste estudo.

Aos animais de laboratório, utilizados na pesquisa, todo meu respeito e gratidão.

À CAPES pelo apoio financeiro de projetos.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para esta realização!

Muito obrigada!!

“Fazer da interrupção, um caminho novo  
Da queda, um passo de dança  
Do medo, uma escada  
Do sonho, uma ponte”  
(Fernando Sabino)

“A persistência é o caminho do êxito”  
(Charles Chaplin)

## RESUMO

O aumento da sobrevivência de pacientes críticos, devido aos avanços tecnológicos, tem resultado em uma população crescente de sobreviventes a síndromes agudas e complexas, como a sepse. Nesta esfera, consequências neuropsiquiátricas têm aumentado nesses indivíduos, como declínio cognitivo, transtorno-depressivo maior e ansiedade. Não obstante, o papel causal de disfunções neurológicas - sejam elas de curto ou longo prazo - relacionadas à sepse ainda permanecem pouco explorados, bem como seus mecanismos fisiopatológicos. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar as repercussões sistêmicas, os parâmetros comportamentais e neuroinflamatórios em camundongos com pneumosepse induzida por instilação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae*. Foram utilizados camundongos Swiss, machos, os quais foram separados aleatoriamente nos seguintes grupos: pneumosepse (animais submetidos à instilação intratraqueal de 0,05 mL de uma solução com *Klebsiella pneumoniae* –  $5,9 \times 10^9$  UFC/animal e controle (animais submetidos à instilação intratraqueal de 0,05 mL de solução tampão - PBS). A fim de ratificar o modelo de pneumosepse, foram avaliados alguns de seus marcadores de lesões sistêmicas características, como níveis de ureia e creatinina, perfil hematológico, presença de unidades formadoras de colônia (UFC) no sangue e no encéfalo e permeabilidade vascular tecidual (Azul de Evans). Em uma segunda etapa experimental, os camundongos foram avaliados quanto aos parâmetros comportamentais nos períodos de 24h, 7, 14 e 30 dias após a pneumosepse. Para tanto, foram realizados teste de campo aberto (TCA), teste do labirinto em cruz elevada (LCE) a fim de avaliar o comportamento tipo ansioso e teste de suspensão pela cauda (TSC) e teste de borrifagem de sacarose (TBS), a fim de avaliar o comportamento tipo-depressivo. O teste de reconhecimento de objetos (RO) foi utilizado a fim de avaliar a memória. O perfil inflamatório, que incluiu a avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e a quantificação dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6), nos pulmões, hipocampo e córtex pré-frontal foi mensurado 24 horas, 7, 14 e 30 dias após a indução da pneumosepse. Adicionalmente, foi realizada a avaliação da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) por meio de Azul de Evans e da ativação microglial, através de imunohistoquímica. Desta forma, este modelo de pneumosepse, resultou em lesão distal ao órgão alvo, com aumento dos níveis de creatinina e ureia nos grupos com pneumosepse, aumento da permeabilidade vascular tecidual em órgãos como pulmão, fígado, intestino e coração. Assim como, alteração da integridade da barreira hematoencefálica em 24 após a lesão, evidenciada por meio de extravasamento de Azul de Evans e disseminação bacteriana no sangue e no encéfalo dos animais nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Além disso, ocorreu um aumento significativo dos níveis de MPO no pulmão (até 7 dias) e córtex pré-frontal (24h) com aumento de citocinas pró-inflamatórias no pulmão, hipocampo e no córtex pré-frontal. Paralelamente foi demonstrado a ativação de micróglia no hipocampo, com aumento da porcentagem da área positiva para IBA1. Foi observado comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso nos animais em todos os períodos avaliados que se correlacionaram com os níveis de citocinas no hipocampo (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), além de alterações na memória de curto prazo nos períodos de 14 e 30 dias após a pneumosepse. Portanto, este estudo demonstrou, pela primeira vez, que a pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* promoveu resposta neuroinflamatória e comportamentos tipo-depressivo e ansioso; bem como alterações de memória à curto prazo, sugerindo um efeito significativo da inflamação pulmonar e sistêmica no SNC.

**Palavras-chave:** Sepse. *Klebsiella pneumoniae*. Disseminação bacteriana. Comportamento. Inflamação. Citocinas.

## ABSTRACT

Technological advances increased survival of critically ill patients with acute and complex syndromes, such as sepsis, increasing neuropsychiatric consequences (e.g., cognitive decline, major depressive disorder, and anxiety). Nevertheless, the causal role of neurological disorders - whether short-term or long-term – and pathophysiological mechanisms related to sepsis remains poorly explored. Thus, this study aimed to characterize systemic repercussions, behavioral and neuroinflammatory parameters in mice with pneumosepsis induced by intratracheal instillation of *Klebsiella pneumoniae*. Male Swiss mice were randomly divided into the following groups: pneumosepsis (animals submitted to intratracheal instillation of 0.05 mL of *Klebsiella pneumoniae* –  $5.9 \times 10^9$  CFU/animal) and controls (animals submitted to intratracheal instillation of 0.05 mL of phosphate buffered solution). We also evaluated some markers of systemic lesion (e.g., urea and creatinine levels, hematological profile, presence of colony-forming units [CFU] in blood and brain and tissue vascular permeability – Evans Blue) to confirm the pneumosepsis model. In a second experimental, behavioral parameters were evaluated 24h, 7, 14, and 30 days after pneumosepsis. Open field test and elevated plus-maze test assessed anxiety-like behavior, whereas tail suspension test and sucrose splash test assessed depressive-like behavior. Object recognition test was used to assess memory. Inflammatory profile, including myeloperoxidation (MPO) activity, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), and interleukin-6 (IL-6) levels in lungs, hippocampus, and prefrontal cortex, was measured 24 hours, 7, 14, and 30 days after pneumosepsis. The blood-brain barrier (BBB) permeability was performed using Evans Blue. Microglial activation was also assessed using immunohistochemistry. This pneumosepsis model resulted in injury distal to the target organ, increased levels of creatinine and urea in mice with pneumosepsis, increased vascular permeability in lungs, liver, intestine, and heart, altered BBB integrity 24 hours after injury (evans blue extravasation), and bacterial dissemination in the blood and brain of animals after 24, 48, and 72 hours. Furthermore, MPO levels increased significantly in the lung (up to 7 days) and prefrontal cortex (24 h), while proinflammatory cytokines elevated in lungs, hippocampus, and prefrontal cortex. Parallel to this, microglial activation was demonstrated in hippocampus, with increased percentage of positive area for IBA1. Depressive-like and anxious-like behaviors were observed in all periods assessed, which correlated with cytokine levels in hippocampus (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6), in addition, changes in short-term memory were observed at 14 and 30 days. Therefore, this study demonstrated, for the first time that pneumosepsis induced by *Klebsiella pneumoniae* promoted neuroinflammatory response and depressive-like and anxious behaviors, as well s short-term memory alterations, suggesting a significant of pulmonary and systemic inflammation in the CNS.

**Keywords:** Sepsis. *Klebsiella pneumoniae*. Bacterial spread. Behavior. Inflammation. Cytokines.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sinalização TLR-ligante na sepse .....	28
Figura 2 – Interação patógeno-hospedeiro na sepse.....	30
Figura 3 – Disfunção orgânica na sepse .....	31
Figura 4 – Sepse, inflamação sistêmica e disfunções no SNC .....	39
Figura 5 – Possíveis mecanismos associados a disfunção do SNC na sepse .....	40
Figura 6 – Modelos de sepse .....	44
Figura 7 – Procedimento cirúrgico de pneumosepse.....	53
Figura 8 - Protocolos experimentais.....	56
Figura 9 - Teste de campo aberto .....	60
Figura 10 - Labirinto em Cruz Elevado.....	61
Figura 11 – Avaliação da construção do ninho .....	62
Figura 12 - Teste de suspensão pela cauda.....	63
Figura 13 - Teste de borrifagem de sacarose.....	64
Figura 14 - Teste de reconhecimento de objetos .....	65
Figura 15 – Regiões hipocâmpais analisadas quanto a % de área positiva para IBA-1 .....	69
Figura 16 - Curva de sobrevivência, disseminação bacteriana, escore clínico e lesão orgânica durante a pneumosepse induzida por <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	74
Figura 17 – Perfil hematológico de animais submetidos à pneumosepse por <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	75
Figura 18 - Consumo (ração, água), peso e bem-estar durante a pneumosepse induzida por <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	76
Figura 19 - Parâmetros comportamentais no teste de campo aberto e labirinto em cruz elevada .....	78
Figura 20 – Parâmetros comportamentais nos testes de suspensão pela cauda e borrifagem de sacarose.....	80
Figura 21 – Parâmetros comportamentais no teste de reconhecimento de objetos .....	81
Figura 22 – Permeabilidade vascular tecidual e BHE em camundongos submetidos a pneumosepse por <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	83
Figura 23 – Atividade de MPO após a indução de pneumosepse com <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	84
Figura 24 – Perfil de citocinas pró-inflamatórias após a indução de pneumosepse com <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	85



Figura 25 - Análise da área positiva para IBA1 no hipocampo após a indução de pneumosepse com <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	89
Figura 26 - Demonstração qualitativa de fotomicrografias com achados fisiológicos e patológicos em animais controles e sépticos .....	90
Figura 27 - Pneumosepse induzida por <i>Klebsiella pneumoniae</i> em camundongos: caracterização comportamental e perfil neuroinflamatório .....	102

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais modelos de sepse: vantagens e desvantagens .....	46
Quadro 2 - Escore clínico .....	58
Quadro 3 – Análise estatística .....	71
Quadro 4 – Correlações entre parâmetros comportamentais e citocinas no hipocampo e córtex pré-frontal .....	87

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Definições de sepse e critérios de diagnóstico .....	25
Tabela 2 - Delineamento dos protocolos experimentais e números de animais utilizados .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APACHE	do inglês “ <i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i> ”
BHE	Barreira hematoencefálica
BT	Bilirrubina total
CCS	Campanha de sobrevivência à Sepsé
CD4	Grupamento de diferenciação 4 expressa na superfície de células T
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CLP	Ligadura e perfuração cecal
CLR	Receptores de lectinas tipo C
DMOS	Disfunção de múltiplos órgãos
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FiO <sub>2</sub>	Fração inspirada de oxigênio
GSA	Aliança Global de Sepsé
HMGB1	Proteína de alta mobilidade Box 1
IBA-1	Proteína-1 adaptadora de ligação de cálcio ionizada
IKK	Cinase I $\kappa$ B
IRAK	Enzima quinase associada ao receptor de interleucina-1
IL	Interleucina
IL-1 $\beta$	Interleucina beta
INF- $\gamma$	Interferon gama
INF- $\alpha$	Interferon alfa
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
INR	Razão normalizada internacional (Razão entre o tempo de protrombina do paciente e o tempo de protrombina normal médio)
IRA	Insuficiência renal aguda
LCE	Labirinto em cruz elevado
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LIRS	Síndrome da resposta inflamatória localizada
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Subtipo de microglia 1
M2	Subtipo de microglia 2

MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade principal
MMP	Metaloproteinase
MPO	Mieloperoxidase
NFκB	Fator nuclear kappa B
NLR	Receptor semelhante a domínios de oligomerização a nucleotídeos
NLRP-3	Inflamossoma NOD-, LRR- e proteína 3 contendo domínio de pirina
NK	Células natural killers
NO	Óxido nítrico
NOD	Proteínas com domínio de ligação à nucleotídeos e oligomerização
OMS	Organização Mundial da Saúde
PaCO <sub>2</sub>	Pressão parcial de monóxido de carbono
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrões moleculares associados aos patógenos
PaO <sub>2</sub>	Pressão parcial de oxigênio
PAS	Pressão arterial sistólica
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
RLR	Receptores semelhantes ao gene um indutíveis por ácido retinóico
RO	Reconhecimento de objetos
SAE	Sepse associada à encefalopatia
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SIRS	Síndrome de resposta inflamatória sistêmica
SNC	Sistema nervoso central
SOFA	do inglês “ <i>Sequential Organ Failure Assessment</i> ”
TBS	Teste de borrifagem de sacarose
TCA	Teste de campo aberto
TEPT	Transtorno de estresse pós-traumático
TLR	Receptores do tipo “toll”
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
T reg	Célula T regulatória
TSC	Teste de suspensão pela cauda
TTP	Tempo de tromboplastina parcial

UTI      Unidade de Terapia Intensiva

UFSC    Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
1.1 SEPSE.....	22
<b>1.1.1 Contexto histórico.....</b>	<b>22</b>
<b>1.1.2 Aspectos epidemiológicos e conceituais .....</b>	<b>23</b>
<b>1.1.3 Etiologia.....</b>	<b>26</b>
<b>1.1.4 Fisiopatologia da sepse .....</b>	<b>27</b>
1.2 INCAPACIDADES E DISFUNÇÕES A CURTO E LONGO PRAZO NA SEPSE .....	31
<b>1.2.1 Disfunção neurológica associada à sepse.....</b>	<b>33</b>
1.3 SEPSE E NEUROINFLAMAÇÃO.....	34
<b>1.3.1 Sinalização de citocinas no SNC.....</b>	<b>34</b>
<b>1.3.2 Alteração na permeabilidade da BHE.....</b>	<b>35</b>
<b>1.3.3 Ativação de células gliais.....</b>	<b>36</b>
<b>1.3.4 Infiltração de células imunológicas no SNC.....</b>	<b>37</b>
<b>1.3.5 Lesão isquêmica cerebral na sepse.....</b>	<b>38</b>
1.4 MODELOS ANIMAIS DE SEPSE.....	40
<b>1.4.1 Validação e translação de modelos animais de sepse .....</b>	<b>40</b>
<b>1.4.2 Categorias de modelos de sepse relacionadas à alteração do SNC .....</b>	<b>43</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>47</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>50</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	50
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	50
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO .....	51
4.2 ANIMAIS E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO .....	51
4.3 MODELO EXPERIMENTAL DE PNEUMOSEPSE.....	52
<b>4.3.1 Expansão e quantificação da bactéria .....</b>	<b>52</b>

<b>4.3.2 Inoculação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em camundongos</b> .....	52
<b>4.3.3 Biossegurança</b> .....	53
<b>4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS</b> .....	54
<b>4.5 ESCORE CLÍNICO</b> .....	58
<b>4.6. PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR</b> .....	58
<b>4.7 TESTES COMPORTAMENTAIS</b> .....	59
<b>4.7.1 Teste do Campo Aberto</b> .....	59
<b>4.7.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado</b> .....	60
<b>4.7.3 Teste do Ninho</b> .....	61
<b>4.7.4 Teste de suspensão pela cauda</b> .....	62
<b>4.7.5 Teste da borrifagem da sacarose</b> .....	64
<b>4.7.6 Teste de Reconhecimento de objeto</b> .....	65
<b>4.8 TESTES BIOQUÍMICOS</b> .....	66
<b>4.8.1 Quantificação da disseminação bacteriana</b> .....	66
<b>4.8.2 Avaliação da função renal</b> .....	66
<b>4.8.3. Avaliação do perfil hematológico</b> .....	66
<b>4.8.4 Avaliação da permeabilidade vascular e BHE</b> .....	66
<b>4.8.5 Atividade da enzima mieloperoxidase nos tecidos pulmonar e encefálico</b> .....	67
<b>4.8.6 Análise das citocinas pró-inflamatórias nos tecidos pulmonar e encefálico</b> .....	67
<b>4.9 IMUNOHISTOQUÍMICA</b> .....	68
<b>4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	70
<b>5 RESULTADOS</b> .....	72
<b>5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE PNEUMOSEPSE INDUZIDA POR <i>Klebsiella pneumoniae</i></b> .....	72
<b>5.1.1 Avaliação da curva de sobrevivência, disseminação bacteriana, escore clínico e lesão orgânica durante a pneumosepse induzida por <i>Klebsiella pneumoniae</i></b> .....	72



5.1.2 Efeitos da pneumosepse induzida por <i>Klebsiella pneumoniae</i> sobre o perfil hematológico...	74
5.1.3 Efeitos da pneumosepse induzida por <i>Klebsiella pneumoniae</i> sobre o consumo alimentar (ração e água), peso e bem-estar animal.....	75
5.2 EFEITO DA PNEUMOSEPSE INDUZIDA POR <i>Klebsiella pneumoniae</i> NOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS AVALIADOS TEMPORALMENTE.....	77
5.2.1 Efeito da pneumosepse nos parâmetros de exploração e emocionalidade nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado .....	77
5.2.2 Efeito da pneumosepse nos parâmetros de emocionalidade nos testes de suspensão pela cauda e de borrifagem de sacarose .....	79
5.2.3 Efeito da pneumosepse nos parâmetros de memória no teste de reconhecimento de objetos.....	80
5.3 EFEITO DA PNEUMOSEPSE INDUZIDA POR <i>Klebsiella pneumoniae</i> NO PERFIL NEUROINFLAMATÓRIO AVALIADOS TEMPORALMENTE .....	82
5.3.1 Efeito da pneumosepse na permeabilidade vascular tecidual e na BHE.....	82
5.3.2 Efeitos da pneumosepse induzida por <i>Klebsiella pneumoniae</i> sobre a atividade da MPO no pulmão, hipocampo e córtex pré-frontal .....	83
5.3.3 Efeitos da pneumosepse induzida por <i>Klebsiella pneumoniae</i> sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no pulmão, hipocampo e córtex pré-frontal.....	84
5.3.4 Correlação entre os níveis das citocinas pró-inflamatórias no hipocampo e córtex pré-frontal e parâmetros comportamentais na pneumosepse induzida por <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	86
5.3.5 Efeitos da pneumosepse induzida por <i>Klebsiella pneumoniae</i> sobre a ativação microglial.....	88
6 DISCUSSÃO .....	91
7 CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIAS .....	103

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SEPSE

### 1.1.1 Contexto histórico

A sepse é uma palavra derivada do grego, *sípsi*, que significa putrefação, decomposição de animais ou vegetais e materiais orgânicos por bactérias. Entre 460-370 a.C., Hipócrates descreveu o termo *sepsis* como uma "distorção ou dissolução de uma estrutura com comprometimento biológico que poderia ocorrer no organismo". Este termo foi utilizado também, por Aristóteles e Galeno, com este mesmo significado (JOHNSON et al., 2005; GEROULANOS; DOUKA, 2006).

A sepse, como manifestação de diferentes endemias e epidemias, causou profundo impacto na história da humanidade. Um dos exemplos mais ilustrativos é a epidemia da peste, que, na sua forma septicêmica, dizimou um terço da população europeia no século XIV (JOHNSON et al., 2005; GEROULANOS; DOUKA, 2006).

No final do século XIX, em 1896, Richard Pfeifer descreveu, pela primeira vez, a "endotoxina" (na parede de *Vibrio cholera*), um componente da parede celular bacteriana, estável ao calor, que ele considerou responsável pelos efeitos tóxicos de bactérias gram-negativas (MOSTEL et al., 2019).

Já no início do século XX, em 1926, a descrição de múltiplos microtrombos associados à sepse vinculou a infecção sistêmica a fenômenos de coagulopatia generalizada, cunhando o termo, hoje conhecido, por coagulação intravascular disseminada (CIVD) (MOSTEL et al., 2019). Na segunda metade do século XX, nas décadas de 1970 e 1980, o papel das citocinas no processo séptico foi descrito por pesquisadores como Gery (1971), Carswell (1975) e Nawroth (1986), que expuseram a atividade central da interleucina-1 (IL-1) e do fator de necrose tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ ) na fisiopatologia da sepse, bem como sua estreita correlação com efeitos pró-coagulantes na esfera endotelial.

No início dos anos 1980, parte do foco de estudos na sepse migrou para o latente desequilíbrio do sistema imunológico, que pode apresentar um comportamento tanto de imunoestimulação como de imunossupressão durante o processo séptico (TRACEY; BEUTLER; LOWRY, 1986). Esta resposta imunológica aparentemente paradoxal envolve uma intrincada

rede de elementos de lesão e reparação tecidual, regada a ajustes metabólicos e geração de mediadores químicos dependentes de uma resposta imunológica adaptativa, sempre com o objetivo final de reestabelecer a função dos órgãos afetados (LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016).

De fato, ao longo do século XX, inúmeros ensaios experimentais e clínicos foram capazes de demonstrar a importância, viabilidade e atividade do sistema imunológico do hospedeiro em resposta às manifestações da sepse. Contudo, devido à heterogeneidade do processo fisiopatológico, as dificuldades em reconhecer, tratar e estudar a sepse manifestaram-se sem demora (GYAWALI; RAMAKRISHNA; DHAMOON, 2019; MONSTEL et al., 2019).

Não obstante, ao longo dos anos, a compreensão da complexa fisiopatologia da sepse evoluiu, assim como a capacidade de defini-la (GYAWALI; RAMAKRISHNA; DHAMOON, 2019; MONSTEL et al., 2019).

### **1.1.2 Aspectos epidemiológicos e conceituais**

Estima-se uma incidência de 48,9 milhões de casos/ano de pacientes com sepse no mundo, contabilizando 11 milhões de mortes/ano. Este montante, de acordo com o estudo conduzido por Rudd e colaboradores (2020), representa cerca de 19,7% de todas as mortes globais. Embora a mortalidade a curto prazo tenha diminuído (52,8%), assim como sua incidência (com queda de 37%), a sepse ainda cursa com uma considerável morbidade, mortalidade pós-hospitalar que resulta em um elevado custo financeiro a qualquer sistema de saúde, seja ele público ou privado (WILHELMS et al., 2010; FLEISCHMANN et al., 2016).

É fundamental destacar que a sepse é a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva (UTIs) não cardiológicas, com elevadas taxas de letalidade. Essas taxas variam, essencialmente, de acordo com as características socioeconômicas do país (MACHADO et al., 2017; RHEE et al.; 2017; LOBO et al., 2019). Apesar de existirem diferenças significativas na incidência e mortalidade na síndrome séptica, aproximadamente 85% dos casos de sepse e mortalidade associada ocorrem em países em desenvolvimento (RUDD et al., 2020).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aprovou uma resolução que reconhece a sepse como uma prioridade de saúde global, e que incentiva campanhas como a *Global Sepsis Alliance* (GSA), a fim de propor e otimizar tomada de decisão visando a prevenção, diagnóstico e tratamento da sepse (REINHART et al., 2017). Por certo, a sepse é um problema clínico de grande relevância, e que vem atraindo a atenção de extensa gama de profissionais de

saúde e pesquisadores devido não somente à complexidade de sua natureza, mas igualmente pelos desafios impostos no tratamento e total reabilitação dos indivíduos acometidos (LEE et al., 2004; ADHIKARI et al., 2010; DAVYDON et al., 2013; FINFER et al., 2013; WALSH et al., 2015; FLEISCHMANN et al., 2016; GODDARD et al., 2016; WADE et al., 2018).

A sepse pode ser a manifestação clínica que resulta de infecções adquiridas tanto no ambiente comunitário quanto em unidades de saúde. As infecções associadas aos cuidados de saúde, que podem resultar em sepse, é um tipo de evento bastante frequente, que ocorre, geralmente, durante algum tipo de prestação de assistência médica-hospitalar (WHO, 2017).

Dados de pesquisas nacionais realizadas no interstício 2010-2016, demonstraram um aumento progressivo do número de casos de sepse nas UTIs Brasileiras, de 19,4% do total de internações em 2010 para 25,2% em 2016. Não obstante, foi observado também uma queda nas taxas de mortalidade, que diminuíram neste mesmo período, de 39%, para 30% (ZAMPIERI et al., 2017; QUINTANA; HAMACHER; JAPIASSÚ, 2018; LOBO et al., 2019).

Apesar dos avanços no entendimento da fisiopatologia e do tratamento da sepse, a própria definição do termo não permanece clara, especialmente devido à heterogeneidade do processo desta síndrome.

Neste sentido, em 1991, uma conferência com especialistas foi proposta e desenvolveu algumas definições iniciais, nas quais a sepse seria, de uma forma geral, uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) associada à infecção (BONE et al., 1992). Alguns anos mais tarde, em 2001, as definições de sepse e choque séptico foram revisadas, a fim de incorporar os limiares para lesões orgânicas (LEVY et al., 2003). Já no início de 2016, as novas definições de sepse e choque séptico foram revisitadas e publicadas e assim, a sepse é atualmente definida como disfunção orgânica com risco de vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção (MERVYN et al., 2016; SEYMOUR et al., 2016; SINGER et al., 2016; GÜL et al., 2017). Na Tabela 1, estão descritas as definições e as diferenças entre elas.

Portanto, a sepse é compreendida, hoje, como uma síndrome heterogênea, uma vez que os pacientes sépticos manifestam vários tipos de disfunção orgânica com mortalidade variável e a curto prazo (ADHIKARI et al., 2010; FINFER et al., 2013).

Tabela 1 – Definições de sepse e critérios de diagnóstico

*Sepsis 1 (1991)*

**SIRS (Síndrome da resposta inflamatória sistêmica):** Caracterizada por ser uma resposta inespecífica do organismo a uma variedade de situações que geram inflamação - infecção, queimaduras, pancreatite aguda, trauma, e outras. Para sua detecção, são necessárias duas das seguintes condições: temperatura > 38,0 °C ou < 36,0 °C, frequência cardíaca > 90 bpm, frequência respiratória > 20 rpm ou PaCO<sub>2</sub> < 32 mmHg, leucócitos > 12.000/mm<sup>3</sup> ou < 4.000/mm<sup>3</sup> ou > 10% de bastões.

**Sepse:** uma resposta sistêmica a infecção, manifestada por dois ou mais critérios da SIRS como resultado de infecção.

**Sepse grave:** Aquela associada com disfunção orgânica, hipoperfusão tissular (caracterizada, entre outros aspectos, por oligúria, distúrbio mental agudo e/ou acidose láctica) ou hipotensão arterial. Pode associar-se a alteração aguda no estado mental.

**Choque séptico:** Hipotensão (não atribuível a outra causa) com hipoperfusão tecidual ocasionada por sepse. Pode ser precoce, quando dura menos de uma hora (em resposta à infusão de solução cristalóide, 0,5-1 litro), ou tardio, com duração maior que uma hora e/ou necessidade de uso de aminas vasoativas.

**DMOS (disfunção de múltiplos órgãos):** Alterações da função de órgãos de um enfermo grave, de modo que a homeostase não pode ser mantida sem intervenção terapêutica.

*Sepsis 2 (2001)*

Infecção documentada ou:

**Parâmetros gerais:**

Temperatura: febre (temperatura > 38,3 °C) ou hipotermia (temperatura < 36,0 °C); frequência cardíaca > 90 bpm ou > 2 DP acima do valor normal para a idade; frequência respiratória: taquipneia; alteração do sensorio; edema importante ou BH positivo (> 20ml/kg/24 horas); hiperglicemia (excluída a possibilidade de diabetes mellitus) - glicemia > 120 mg/dl.

**Parâmetros inflamatórios:**

Leucograma: Leucocitose (contagem de leucócitos > 12.000 / mm<sup>3</sup>); leucopenia (contagem de leucócitos < 4000 / mm<sup>3</sup>); contagem de leucócitos com > 10% de formas imaturas; proteína C reativa plasmática > 2 DP acima do valor normal e procalcitonina plasmática > 2 DP acima do valor normal.

**Parâmetros hemodinâmicos:**

Pressão arterial: hipotensão – PAS < 90mmHg, PAM < 70 mmHg ou redução da PAS > 40 mmHg em adultos; ou PAS/PAM < 2 DP abaixo do normal para a idade; saturação de oxigênio venoso misto: > 70%, índice cardíaco > 3,5 litros/min.

**Parâmetros de disfunção orgânica**

Gasometria arterial: hipoxemia (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> < 300); função renal: oligúria aguda (diurese < 0,5ml/kg/h) e creatinina sérica > 0,5mg/dl, coagulação sangüínea: INR > 1,5 ou TTP > 60s ou plaquetopenia (< 100.000/mm<sup>3</sup>), íleo paralítico (ausência de ruídos hidroaéreos); bilirrubinas: hiperbilirrubinemia (BT > 4mg/dl)

**Parâmetros de perfusão tecidual:**

Lactato sérico: hiperlactatemia (> 2,5mmol/l) Enchimento capilar reduzido

*Sepsis 3 (2016)*

Sepse é definida como a presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida secundária à resposta desregulada do organismo à infecção

**Critérios clínicos para sepse:**

O diagnóstico clínico de disfunção orgânica se baseia na variação de dois ou mais pontos no escore *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA)

Critérios qSOFA:

Estado mental alterado (GCS pontuação <15); pressão arterial sistólica <100 mmHg; frequência respiratória > 22 rpm

**Choque séptico:** subgrupo dos pacientes com sepse que apresentam acentuadas anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas e associadas com maior risco de morte que a sepse isoladamente. Os critérios diagnósticos de choque séptico são a “necessidade de vasopressor para manter uma pressão arterial média acima de 65 mmHg após a infusão adequada de fluidos, associada a nível sérico de lactato acima de 2 mmol/L”

Fonte: BONE et al., 1992; LEVY et al., 2003; MERVYN et al., 2016; SEYMOUR et al., 2016; SINGER et al., 2016

Muitos fatores contribuem para o aumento da incidência dos casos de sepse, tais como aumento da população e da expectativa de vida. Nesta seara, o incremento no número de pessoas com idade avançada e de pacientes portadores de doenças crônicas que sobrevivem ao insulto microbiano inicial pode contribuir para a geração de uma população suscetível ao desenvolvimento de infecções mais graves, como a sepse (MARTIN et al., 2003; HARPAZ; DAHL; DOOLING, 2016).

Além disso, fatores como o crescimento da resistência bacteriana, períodos prolongados de internação hospitalar e a utilização intensiva de procedimentos invasivos, também cooperam para as estatísticas elevadas de sepse (MARTIN et al., 2003; HARPAZ; DAHL; DOOLING, 2016).

As diretrizes de tratamento que recomendam o uso de definições para sepse publicadas no início do século XXI permitiram o lançamento de campanhas de conscientização sobre a sepse, resultando em uma redução acentuada no número de casos. Além disso, iniciativas como a Campanha de Sobrevivência à Sepse (CSS) e a *Global Sepsis Alliance* (GSA) foram fundamentais para determinar uma melhor identificação dos pacientes sépticos e a maior notificação da síndrome (LEVY et al., 2009).

### **1.1.3 Etiologia**

Devido a sua complexidade, a sepse pode abranger uma gama de fatores que podem influenciar na sua evolução clínica, tais como comorbidades associadas, idade, gênero e etnia, além de variar com o órgão primário atingido pela infecção, a imunidade do hospedeiro e o tipo de microrganismo envolvido. Neste sentido, a sepse pode ser originada a partir de qualquer tipo de microrganismo, - principalmente bactérias -, mas pode incluir vírus, fungos e outros parasitas (KAUKONEN et al., 2014; ANGUS, POLL; 2013).

As infecções frequentemente associadas à sepse são decorrentes de pneumonia, infecção intra-abdominal e infecção urinária. Neste universo, de acordo com estudos epidemiológicos, infecções no sistema respiratório são os principais focos dos casos sépticos, contribuindo com mais de 50% das ocorrências registradas. Adicionalmente, as pneumonias nosocomiais (ou hospitalares - definida como infecção pulmonar que ocorre depois de aproximadamente 48 horas de internação hospitalar) causadas por bactérias gram-negativas e as gram-positivas, prevalentes em casos de pneumonia comunitária, lideram o índice de mortalidade na sepse (KAUKONEN et al., 2014; ANGUS; POLL, 2013; MAYR; YENDE; ANGUS, 2014).

Neste sentido, os bacilos gram-negativos são os principais representantes na maioria dos casos de sepse e o agente *Klebsiella pneumoniae* é um dos mais frequentes, entretanto, microorganismos gram-positivos também contribuem para o número de casos, como *Staphylococcus aureus* (TANRIOVER et al., 2006).

Em um estudo brasileiro realizado em 75 UTIs, os bacilos gram-negativos representaram a maior parte dos casos na qual o agente identificado com maior predominância foi *Pseudomonas aeruginosa*, seguidos dos cocos gram-positivos, com predominância de *Staphylococcus aureus* (SALES et al., 2006). Alguns anos mais tarde, Silva e colaboradores (2012) descreveram que durante a análise de 90 UTIs brasileiras, os agentes mais encontrados foram gram-negativos (72%), seguidos dos gram-positivos (33,9%) e fungos (14,5%). Entre os cocos Gram-positivos, os mais frequentes foram *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e entre os bacilos Gram-negativos, *Pseudomonas sp*, *Klebsiella sp* e *Acinetobacter sp* foram identificados com maior frequência.

Outros focos infecciosos frequentes incluem catéteres, abscessos de partes moles, meningites e endocardites (KAUKONEN et al., 2014; MAYR; YENDE; ANGUS, 2014).

#### 1.1.4 Fisiopatologia da sepse

De uma maneira geral, a interação entre microrganismos e hospedeiro se inicia pelo reconhecimento do agente etiológico. No momento em que se inicia uma infecção, as células sanguíneas do sistema imunológico inato, como monócitos, macrófagos e neutrófilos são ativadas e iniciam o processo de defesa do organismo (FLOHÉ et al., 2006; DEUTSCHMAN, TRACEY, 2014; VAN DER POLL et al., 2017).

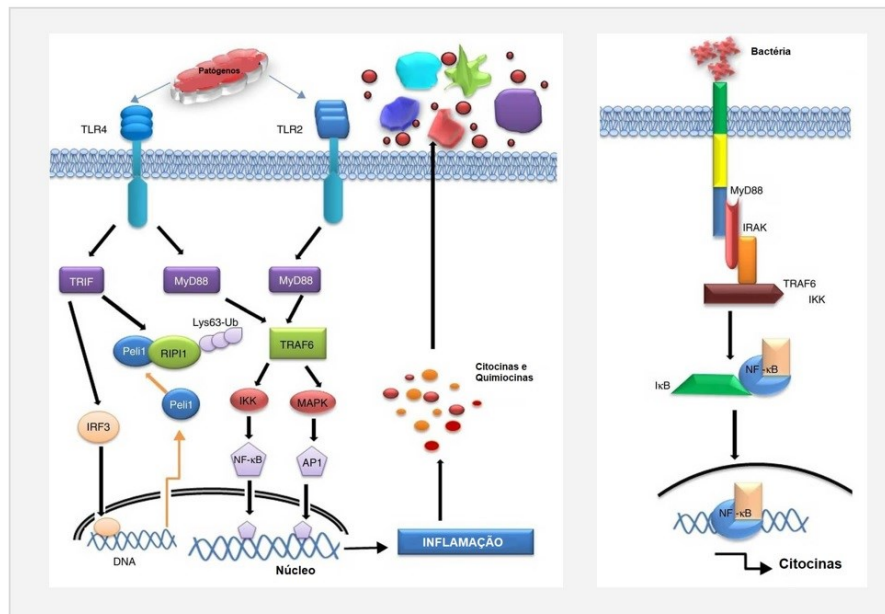
Os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP's - do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*) são estruturas moleculares expressas por grupos de patógenos, identificáveis pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRR, do inglês, *pattern recognition receptors*) expressos por células do sistema imunológico inato (TAKEUCHI, AKIRA, 2010; HOTCHKISS et al., 2016; VAN DER POLL et al., 2017).

Entre os PAMPs mais estudados, as endotoxinas de bactérias gram-negativas formadas principalmente por lipopolissacarídeos (LPS), são reconhecidas pelos receptores do tipo *Toll-like* (TLR4). A CD-14, glicoproteínas expressas na membrana de leucócitos (do inglês, *cluster of differentiation 14*), atua como co-receptor associado à receptores TLR4 e auxilia na ativação celular após o reconhecimento de PAMPs (MEDZHITOV, 2001).

Outras moléculas da família *Toll-like* também estão implicadas na resposta imunológica inata, como TLR2, na sinalização dos proteoglicanos das bactérias Gram-positivas, o TLR3, relacionado à identificação de RNA de dupla hélice, o TLR5, capaz de identificar flagelina, e o TLR9, que reconhece o dinucleotídeo CpG-DNA não metilado bacteriano ou viral (FLOHÉ et al., 2006; MEDZHITOV, 2001). Após a ligação entre os PAMPs e os TLR, diferentes vias de sinalização são ativadas (Figura 1), incluindo a participação das proteínas intracelulares de receptores semelhantes a domínios de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NOD, do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain like-receptor*) e proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88, do inglês, *myeloid differentiation protein 88*) (COHEN, 2002; TANG et al., 2012).

A interação entre MyD88 com a enzima quinase associada ao receptor de interleucina-1, (IRAK, do inglês, *IL-1 Receptor-Associated Kinase*) leva a ativação do complexo cinase I $\kappa$ B (IKK), que fosforila o inibidor do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B, do inglês, *factor nuclear kappa B*), o I $\kappa$ B. A fosforilação do I $\kappa$ B pelo IKK leva à sua degradação por proteossomas, liberando o dímero NF- $\kappa$ B citosólico, que então, se transloca para o núcleo da célula e regula a transcrição de diversos genes, como aqueles que codificam diversas citocinas (COHEN, 2002; TANG et al., 2012).

Figura 1 – Sinalização TLR-ligante na seps



Legenda: Desenho esquemático que representa as vias de sinalização em resposta ao ligante específico do patógeno. Mecanismo de sinalização induzida a partir da interface TLR-ligante para mediar a resposta inflamatória. Fonte: adaptado de MUKHERJEE; KARMAKAR; BABU (2016).



A produção e liberação de inúmeras citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas 1 (IL-1), 2 (IL-2), 6 (IL-6), 8 (IL-8), 12 (IL-12) e TNF- $\alpha$  são eventos fisiopatológicos cruciais no desenvolvimento da sepse (ANGUS, POLL; 2013; HOTCHKISS et al., 2016; VAN DER POLL et al., 2017). Paralelamente, as citocinas anti-inflamatórias, como as interleucinas 4 (IL-4), 5 (IL-5), 10 (IL-10), 11 (IL-11) e 13 (IL-13), também são produzidas, criando um ambiente de auto-modulação na sepse (ANGUS, POLL; 2013; HOTCHKISS et al., 2016; VAN DER POLL et al., 2017).

A regulação deste equilíbrio pró/anti-inflamatório é complexa (Figura 2), e a gênese de ativação da resposta imunológica adaptativa está a cargo dos monócitos/macrófagos, que ao fagocitarem células necróticas ou mesmo bactérias, induzem os linfócitos a assumir um fenótipo Th1, o que, por sua vez, resulta na liberação de substâncias pró-inflamatórias, como interferon alfa (INF- $\alpha$ ), interferon delta (INF- $\delta$ ) e IL-2. De modo conjunto, uma vez que os monócitos/macrófagos fagocitam células apoptóticas, ocorre a ativação do fenótipo linfocitário Th2, resultando na produção de citocinas como IL-4 e IL-10, que reduzem a resposta pró-inflamatória (HOTCHKISS et al., 2001; ANGUS, POLL; 2013).

Estes eventos fisiopatológicos propiciam o desenvolvimento de alterações microvasculares na sepse, como um estado pró-coagulante por meio da inibição da trombomodulina, liberação de fatores da cascata de coagulação e potencialização de agregação plaquetária. Desta forma, alterações de cunho hemodinâmico, como aumento da permeabilidade vascular e diminuição da resistência vascular periférica são condições geralmente observáveis à beira do leito do paciente séptico (AGUIRRE, PÁRAMO, 1999; ANGUS; POLL; 2013).

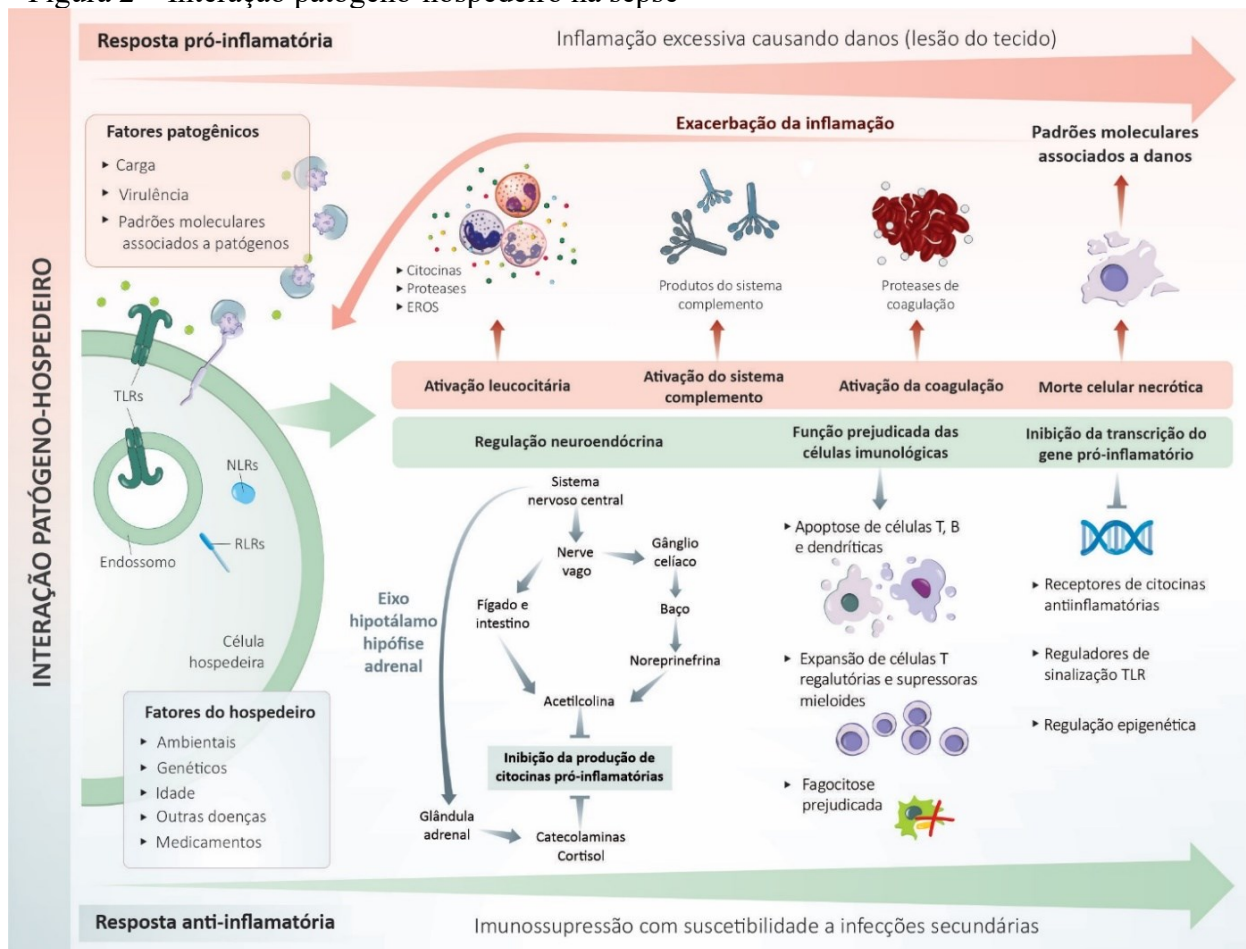
Ainda neste domínio, as endotoxinas também induzem à liberação de calicreína, cininogênio e bradicinina (pela ativação do fator XII - fator de Hageman), sendo esta última um potente agente vasodilatador e hipotensor. Vale ressaltar que a ativação do fator XII pode, ainda, acionar a via intrínseca da coagulação, resultando em coagulação intravascular disseminada (CIVD) (AGUIRRE, PÁRAMO, 1999; INCE et al., 2016).

De modo associado, o aumento dos níveis de óxido nítrico no âmbito das alterações vasculares - bastante comum na sepse - contribui para um estado de vasodilatação significativo, amplificando o quadro de hipotensão (AGUIRRE, PÁRAMO, 1999; WEBERPALS et al., 2009; INCE et al., 2016)

A progressão da sepse pode levar a disfunções em muitos órgãos e sistemas (Figura 3). Alguns estudos sugerem que, a despeito de seu caráter múltiplo e complexo, o mecanismo

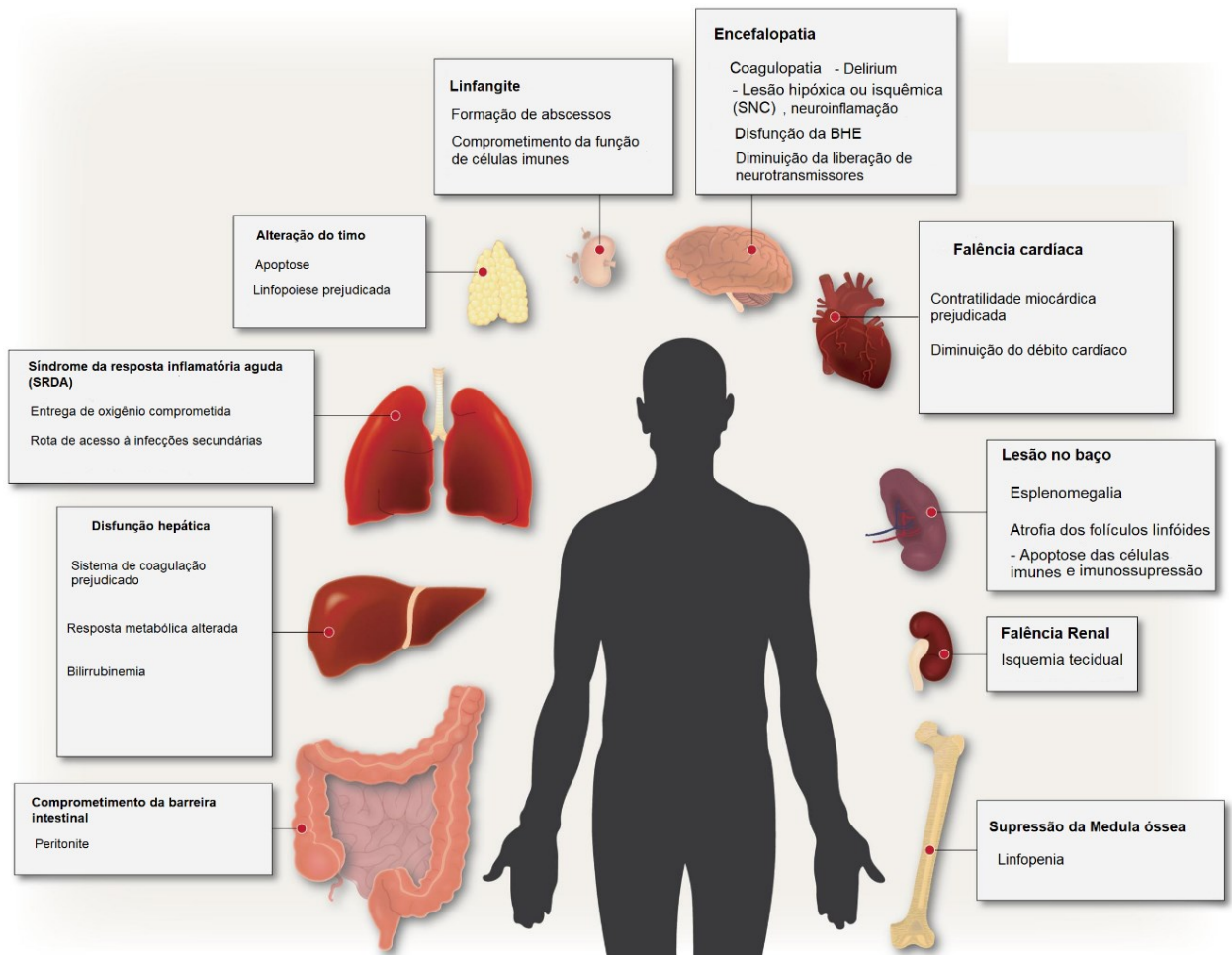
provável de injúria resulta de um conjunto patológico que inclui lesão endotelial disseminada, edema intersticial e hipovolemia, além dos distúrbios da coagulação. Todos esses fenômenos podem levar à hipóxia tissular e a hiperlactatemia, que estão intimamente associados com a gravidade da doença e à morte celular (ANGUS, POLL; 2013; HOTCHKISS et al., 2016; VAN DER POLL et al., 2017).

Figura 2 – Interação patógeno-hospedeiro na sepse



Legenda: Desenho esquemático que representa a interação patógeno-hospedeiro. A resposta do hospedeiro à sepse é caracterizada por respostas pró-inflamatórias (parte superior do painel, em vermelho) e respostas imunossupressoras anti-inflamatórias (parte inferior do painel, em azul). A direção, extensão e duração dessas reações são determinadas por fatores do hospedeiro e fatores patogênicos. As respostas inflamatórias são iniciadas pela interação entre padrões moleculares associados a patógenos expressos por patógenos e receptores de reconhecimento de padrões expressos por células hospedeiras na superfície celular (receptores *toll-like* [TLRs] e receptores de lectina tipo C [CLRs]), no endossomo (TLRs), ou no citoplasma (receptores semelhantes ao gene 1 indutíveis por ácido retinóico [RLRs] e receptores semelhantes a domínios de oligomerização de ligação a nucleotídeos [NLRs]). A consequência da inflamação exacerbada é o dano ao tecido e a morte celular necrótica. Fonte: Adaptado de ANGUS, POLL (2013).

Figura 3 – Disfunção orgânica na sepse



Legenda: Distúrbios na sepse envolvendo vários órgãos, desde coagulação alterada, supressão imunológica até inflamação e falência de múltiplos órgãos. Destaca-se a disfunção associada ao SNC e suas repercussões, tema desta tese. Fonte: adaptado de NEDEVA, MENASSA, PUTHALAKATH, 2019.

## 1.2 INCAPACIDADES E DISFUNÇÕES A CURTO E LONGO PRAZO NA SEPSE

Nos últimos anos houve diminuição significativa da mortalidade em indivíduos sépticos no ambiente intra-hospitalar, resultando em um grande número de pacientes sobreviventes (IWASHYNA et al., 2011; KAUKONEN et al., 2014; WIDMANN, HENEKA, 2014).

Dados emergentes relatam que os sobreviventes de sepse têm uma trajetória de saúde distinta antes e após o evento infeccioso, apresentando um risco aumentado de declínio funcional, cognitivo e distúrbios neuropsiquiátricos, assim como deterioração das condições crônicas de

saúde prévias à internação hospitalar (IWASHYNA et al., 2010; PRESCOTT; ANGUS, 2018a). Entretanto, o papel causal nestas disfunções a curto e longo prazo permanecem pouco elucidados.

O prognóstico do paciente sobrevivente da sepse pode variar muito, dependendo do seu estado de saúde prévio (pré-sepse), das características do episódio séptico (como por exemplo, a gravidade da infecção e a resposta do hospedeiro ao insulto infeccioso), bem como da qualidade do tratamento hospitalar (PRESCOTT; ANGUS, 2018b).

Estudos demonstram que, da metade dos pacientes que se recuperam após a sepse, um terço vai à óbito no ano seguinte, e um sexto apresentam incapacidades persistentes que incluem o desenvolvimento de até duas novas limitações funcionais (por exemplo, incapacidade de tomar banho ou vestir-se de maneira independente) (IWASHYNA et al., 2010).

Neste âmbito, sabe-se que a sepse é um fator de risco importante para o desenvolvimento de fraqueza muscular adquirida na UTI, também denominada de polineuromiopia do paciente crítico. Por esta razão, muitos pacientes sépticos, mesmo após a alta hospitalar, apresentam um declínio funcional significativo, com lenta recuperação (KRESS; HALL, 2014; BORGES et al., 2015).

De modo complementar, alguns estudos descrevem um aumento de três vezes, aproximadamente, na prevalência de alterações cognitivas, que podem variar em graus de moderada a grave (6,1% antes da hospitalização para 16,7% após a internação), e, ainda, uma alta prevalência de problemas de saúde mental, incluindo ansiedade, depressão e transtorno de estresse pós-traumático (PRESCOTT et al., 2016). Além disso, o estudo de Prescott e colaboradores (2016) descreveu que cerca de 40% dos pacientes podem ser reinternados dentro de 90 dias após a alta hospitalar, geralmente devido condições como infecções (pulmonares e/o urinárias) e exacerbações de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), bem como insuficiência renal e eventos cardiovasculares, como infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico e arritmias.

Ademais, relato de sintomas como dormência, dor e distúrbios visuais também podem ser frequentes após a sepse (POULSEN et al., 2009; WINTERS et al., 2010). Alguns estudos também abordam, de maneira muito interessante, o tempo necessário para que os pacientes acometidos por sepse retornem às suas rotinas habituais. Poulsen e colaboradores (2009), por exemplo, demonstraram que 43% dos pacientes retornam ao trabalho dentro de 1 ano após o evento séptico, enquanto Yende e colaboradores (2016) descreveram que apenas 33% retornam às atividades de vida diária de modo independentemente após 6 meses da alta hospitalar.

De fato, todos estes fatores têm impacto na diminuição da qualidade de vida, no desempenho profissional e nas relações sociais desses indivíduos (SCHMIDT et al., 2016; WINTERS et al., 2010; YENDE et al., 2016), o que torna imprescindível estudos que abarquem estas perspectivas no período pós-sepse.

### 1.2.1 Disfunção neurológica associada à sepse

Alterações relacionadas à disfunções neurológicas, como encefalopatia, depressão, ansiedade e alterações cognitivas são frequentemente relatadas em pacientes com sepse (HOSOKAWA et al., 2014; SHARSHAR; BOZZA; CHRÉTIEN, 2014; TSURUTA; ODA, 2016). Adicionalmente, a sepse pode cursar com graus variáveis de alteração do nível de consciência, evoluindo de confusão mental, torpor e até mesmo coma. Pacientes com sepse associada a encefalopatia (SAE, do inglês, *sepsis associated encephalopathy*), podem evoluir com delirium leve e até mesmo para estados comatosos (GOFTON; YOUNG, 2012; TSURA; ODA, 2016). Destaca-se, ainda, que a SAE está associada à um pior prognóstico e maior mortalidade dos pacientes (RUSSELL et al., 2000; SCHULER et al., 2018).

Um recente estudo de coorte demonstrou uma alta taxa de mortalidade tardia (após a alta hospitalar) em indivíduos sépticos (SCHULER et al., 2018). A mortalidade intra-hospitalar ocorreu em 9,4% dos pacientes sépticos e foi associada à gravidade da disfunção orgânica aguda (particularmente nas esferas neurológica, respiratória e cardíaca). No entanto, em 3 anos pós evento séptico, houve uma incidência de mortalidade de 60% destes indivíduos. Salienta-se que neste estudo, a disfunção neurológica foi mais fortemente associada com a mortalidade tardia (SCHULER et al., 2018).

Além disso, algumas pesquisas têm demonstrado uma alta prevalência de ansiedade (32%) e transtorno depressivo (29%) em pacientes sépticos após 2 a 3 meses da alta da UTI, assim como uma prevalência de 44% de transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) em um período que pode compreender de 1 a 6 meses após a alta hospitalar (NIKAYIN et al., 2016; RABIEE et al., 2016; PARKER et al., 2015).

Não existem evidências claras se o transtorno depressivo, ansiedade ou TEPT são exacerbados pela sepse ou se são mais prevalentes em indivíduos que desenvolvem sepse quando comparado a outros tipos de doenças (IWASHYNA et al., 2010; PRESCOTT; ANGUS, 2018b). Apesar desta ambivalência, pacientes sobreviventes à sepse demonstraram 3,3 vezes maior risco potencial de desenvolver algum tipo de injúria cognitiva moderada ou grave (IWASHYNA

et al., 2010). O comprometimento cognitivo associado à sepse pode persistir mesmo após anos do evento séptico (IWASHYNA et al., 2010; GIRARD, 2013).

Paralelamente, outros estudos sugerem que a disfunção neurológica aguda relacionada à sepse representa um preditor importante de incapacidades funcionais a longo prazo (ANDERSON et al., 2016; HENSLEY; PRESCOTT, 2018b; PRESCOTT et al., 2016).

### 1.3 SEPSE E NEUROINFLAMAÇÃO

Alguns estudos têm descrito que a disfunção no sistema nervoso central (SNC) que pode ocorrer durante e após a sepse é decorrente da interação de diferentes mecanismos relacionados à resposta inflamatória sistêmica (Figuras 4 e 5) (RIEL; VERDIJK; KUIKEN, 2015; SONNEVILLE et al., 2013; VAN DER POLL et al., 2017).

A despeito da necessidade de maior clareza a respeito dos mecanismos envolvidos, alguns estudos sugerem que a resposta cerebral para a inflamação sistêmica na sepse é disparada por uma ativação de sinais que são mediados basicamente por três vias, a saber: (1) rotas que envolvem alterações estruturais na barreira hematoencefálica (BHE) induzidas pela ativação de células endoteliais, que liberam mediadores inflamatórios (metabólitos, espécies reativas de oxigênio) e resultam no aumento da permeabilidade do parênquima cerebral à substâncias da corrente sanguínea; (2) o trajeto neural, que requer a ativação de sistema nervoso aferente primário, como o nervo vago e nervos sensoriais (olfativos) por meio do estímulo periférico de PAMPs e citocinas pró-inflamatórias e, por fim, a via humoral (3), que envolve mediadores circulantes (como citocinas), que sinalizam respostas ao cérebro, aos órgãos circumventriculares, ao plexo coróide e para a BHE (LICINIO, MASTRONARDI, WONG, 2008; RIEL; VERDIJK; KUIKEN, 2015; SONNEVILLE et al., 2013; VAN DER POLL et al., 2017).

#### 1.3.1 Sinalização de citocinas no SNC

As citocinas mais estudadas na sepse são TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , as quais são capazes de promover a ativação de células imunológicas a amplificar a produção e liberação de mediadores inflamatórios (SCHULTE, BERNHAGEN, BUCALA, 2013). Alguns estudos demonstraram que a produção de citocinas no SNC é um evento precoce durante a sepse, com um aumento significativo nas concentrações de IL-1 $\beta$  em 12 horas e IL-10 e TNF- $\alpha$  em 6 horas em tecidos

cerebrais após a indução de sepse em camundongos (TEELING, PERRY, 2009; COMIM et al., 2011).

Citocinas de natureza pró-inflamatória como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 associadas a espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) agem sobre as barreiras cerebrais, ativando suas células e aumentando a permeabilidade da BHE (TSAO et al., 2001).

As pesquisas realizadas tanto em experimentos animais quanto em ensaios clínicos em humanos apontam para uma mesma direção: a de que a inflamação que ocorre no SNC após a sepse pode ocorrer de forma aguda, mas perdurar à longo prazo e relacionar-se com comportamentos tipo-depressivo e ansioso, assim como com disfunções cognitivas a longo prazo (TEELING, PERRY, 2009; COMIM et al., 2011; BIESMANS et al., 2016).

Neste sentido, a proteína de alta mobilidade Box 1 (HMGB1, do inglês *High Mobility Group Box-1*), secretada por células imunológicas (monócitos, macrófagos e células dendríticas), tem se tornado um alvo potencial para prevenção de síndromes neurológicas pós-sepse, como comprometimentos cognitivos e alterações comportamentais tipo-depressivo, uma vez que pode ser considerada, por muitos autores, um mediador tardio da neuroinflamação séptica (CHAVAN et al., 2012; LIAN et al., 2017; MOSTEL et al., 2019).

### 1.3.2 Alteração na permeabilidade da BHE

Os mecanismos que envolvem o comprometimento da barreira cerebral na sepse ainda não estão totalmente elucidados (ENGELHARDT; SOROKIN, 2009; DANIELSKI et al., 2018). Não obstante, sabe-se que a BHE é formada por células endoteliais que envolvem os capilares do SNC, alterando de forma seletiva a permeabilidade de substâncias para o parênquima cerebral. Esta função protetora dificulta a entrada de patógenos, macromoléculas hidrofílicas - como as citocinas - e células imunológicas, como neutrófilos ativados. Desta forma, a presença da BHE faz com que o SNC seja imunologicamente protegido (ENGELHARDT, SOROKIN, 2009; KEANEY, CAMPBELL, 2015).

Interessantemente, as células da BHE possuem em suas membranas receptores do tipo *toll*, receptores para citocinas e quimiocinas, e, assim, respondem à presença de moléculas imunoativas (SINGH et al., 2015). Associadamente à ação de citocinas pró-inflamatórias, EROs e moléculas de adesão leucocitária, a ativação de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases de matriz (MMPs, do inglês *matrix metalloproteinases*), também podem induzir ao aumento da permeabilidade da BHE, com degradação da lâmina basal (que envolve



as células endoteliais da BHE) e de proteínas intercelulares (junções endoteliais aderentes, reguladoras da permeabilidade da BHE) (CANDELARIO-JALIL et al., 2011; DAL-PIZZOL et al. 2013; SINGH et al., 2015).

Portanto, como consequência do aumento da permeabilidade da BHE, o SNC permanece mais vulnerável à ação de moléculas neurotóxicas, potencializando o processo de neuroinflamação (SINGH et al., 2015).

### 1.3.3 Ativação de células gliais

A micróglia atua como a principal linha de defesa do cérebro após a proteção da BHE, desempenhando um papel fundamental na resposta imunológica inata do SNC (HANISCH et al., 2013; STANKOVIC et al., 2015). As células microgлияis participam da estrutura da sinapse, com ação fagocitária muito semelhante aos macrófagos no sistema periférico (HANISCH, KETTENMANN, 2007; HANISCH, 2013; STANKOVIC et al., 2015).

Além disso, a micróglia expressa em sua superfície diferentes tipos de receptores, como os receptores *Toll like*, complexo de histocompatibilidade principal (MHC-II), receptor de quimiocinas CX3CR1 e CD11b / CD45 (TOWN; NIKOLIC; TAN, 2015).

Estas células extremamente plásticas podem exibir vários fenótipos, de acordo com mudanças no microambiente cerebral (HANISCH; KETTENMANN, 2007; HANISCH, 2013). De maneira geral, a microglia pode ser classificada em dois tipos principais: micróglia em “repouso” com morfologia ramificada (fenótipo M2), presente no encéfalo “saudável” e microglia ativada com morfologia amebóide (fenótipo M1), geralmente presente após insultos cerebrais (HANISCH; KETTENMANN, 2007; HANISCH, 2013).

Alguns estudos demonstram que traumas, infecções, sepse, neoplasias, a desmielinização e a neurodegeneração ativam a microglia (PERRY; NICOLL; HOMES, 2010; HANISCH, 2013; STANKOVIC et al., 2015; MICHELS et al.; 2017).

Uma vez ativada, a microglia pode realizar funções de reparo, induzir citotoxicidade e modular a resposta imunológica, além de liberar diversos marcadores inflamatórios como citocinas, proteases, quimiocinas e EROs, gerando neuroinflamação (HANISCH; KETTENMANN, 2007; RANSOHOFF; PERRY, 2009; RANSOHOFF; CARDONA, 2010; PERRY; NICOLL; HOMES, 2010; PERRY; TEELING, 2013; RANSOHOFF, 2016). A ativação microglial pode representar uma das alterações iniciais observadas na disfunção



cerebral, e, quando prolongada, pode afetar negativamente outras células, como os neurônios (PAVLOV et al., 2006; HOVENS et al., 2015 ; MICHELS et al., 2017).

Desse modo, após um insulto séptico, componentes de imunorreatividade presentes na corrente sanguínea podem ativar a microglia e outras células ao atravessar a BHE (SEMMLER et al., 2005; MELIEF et al., 2012). Paralelamente, a ativação microglial também foi associada a uma expressão aumentada de TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e óxido nítrico sintase induzida (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase*) no SNC após inflamação sistêmica (SEMMLER et al.; 2005; HOOGLAND et al., 2015).

Os astrócitos também são células importantes encontradas no SNC com funções cruciais, como a manutenção das propriedades da BHE e suporte de sua integridade (WILSON; DRAGAN, 2005). Neste sentido, os astrócitos ativados podem exacerbar a permeabilidade da BHE (PAPADOPOULOS et al., 2000). Em estudos experimentais, foi observado que a ativação de astrócitos foi observada no hipocampo com pico de ativação 24 horas após o insulto séptico (SEMMLER et al., 2005).

Neste contexto, a ativação da microglia e da astroglia produz aumento de mediadores inflamatórios (e está associada ao comprometimento da integridade da BHE) o que permitiria a passagem de fatores neurotóxicos, como citocinas, EROs e glutamato, sustentando e retroalimentando o processo neuroinflamatório (SEMMLER et al., 2005; MELIEF et al., 2012; MICHELS et al., 2017).

#### **1.3.4 Infiltração de células imunológicas no SNC**

O recrutamento de leucócitos no SNC é uma característica de muitas doenças do SNC como acidente vascular encefálico, esclerose múltipla e trauma (POLI et al., 2013). Neste sentido, um estudo demonstrou a detecção de neutrófilos no líquido cefalorraquidiano em pacientes com sepse (DIETZEL et al., 2008).

Alguns estudos têm demonstrado que uma grande proporção dos infiltrados iniciais observados no SNC após a exposição séptica são compostos de monócitos, macrófagos e neutrófilos, que permanecem em estado hiper-responsivo (MUNOZ et al., 1991; SFEIR et al., 2001; McDERMOTT et al., 2017; REN et al., 2020). Nesta situação, ocorre uma produção exacerbada de citocinas e mediadores inflamatórios, com incremento na atividade da mieloperoxidase - por neutrófilos - e potencialização de danos oxidativos, observados em casos de SAE (KENNE et al., 2012).

Porém, pouco se sabe sobre o mecanismo migratório de células imunológicas como neutrófilos em direção ao SNC. Estudos sugerem que o recrutamento dessas células ocorre após a ativação endotelial e está associado à ruptura da BHE (POLI et al., 2013, HE et al., 2016). De fato, Zhou e colaboradores (2009) demonstraram o papel essencial da atividade endotelial na indução do recrutamento de neutrófilos na vasculatura do SNC em inflamação sistêmica.

O estudo de He e colaboradores (2016) demonstrou o recrutamento de neutrófilos regulados por células NK (do inglês, “*natural killer*”) no SNC, um evento importante para a geração da neuroinflamação induzida pela sepse. A infiltração de células NK no SNC exibem atividade quimiotática para neutrófilos, associado a expressão aumentada de quimiocinas como a CXCL2 (HE et al., 2016).

As células NK ainda podem recrutar indiretamente células como neutrófilos, por meio do “*crosstalk*” entre as células imunológicas, especialmente a microglia, uma vez que as células residentes do tecido têm o potencial de recrutar neutrófilos para o local da lesão (KIM, LUSTER, 2015; HE et al., 2016).

Paralelamente, também há diminuição de células dendríticas circulantes, com desequilíbrio entre células T regulatórias (Treg) e fenótipos de células T pró-inflamatórias, (PENA et al., 2011).

### **1.3.5 Lesão isquêmica cerebral na sepse**

O fluxo sanguíneo cerebral é considerado significativamente menor em pacientes com sepse, mostrando uma forte associação com o comprometimento do metabolismo cerebral (BOWTON et al., 1989; TACCONE et al.; 2014).

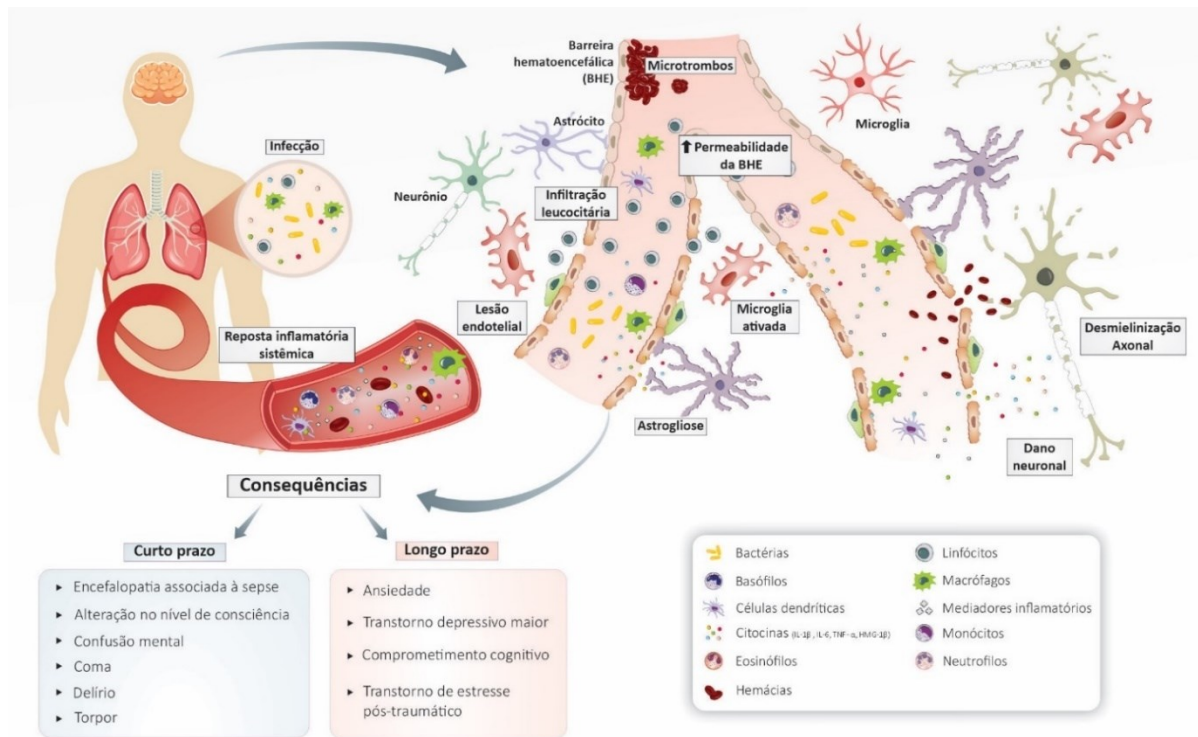
Vários fatores estão envolvidos na patogênese de perfusão e microcirculação cerebral prejudicada na sepse e choque séptico, como vasoconstrição anormal, insultos inflamatórios e utilização de vasopressores (BURKHART; SIEGEMUND; STEINER et al., 2010). Além disso, a auto-regulação cerebrovascular apresenta deficiência acentuada durante o processo séptico, atuando como um dos principais mecanismos na lesão isquêmica (SCHRAMM et al., 2012).

Na esfera experimental, Vachharajavi e colaboradores (2005), em um modelo de indução de sepse por ligadura e punção do ceco (CLP, do inglês *cecal ligation and puncture*) demonstraram que o fenótipo protrombogênico também é observado de maneira aguda (4 h após o insulto séptico). De fato, a CIVD é supostamente responsável por extensa isquemia cerebral,

com desfechos negativos no choque séptico, como associação com mortalidade. (MAZERAUD et al., 2016).

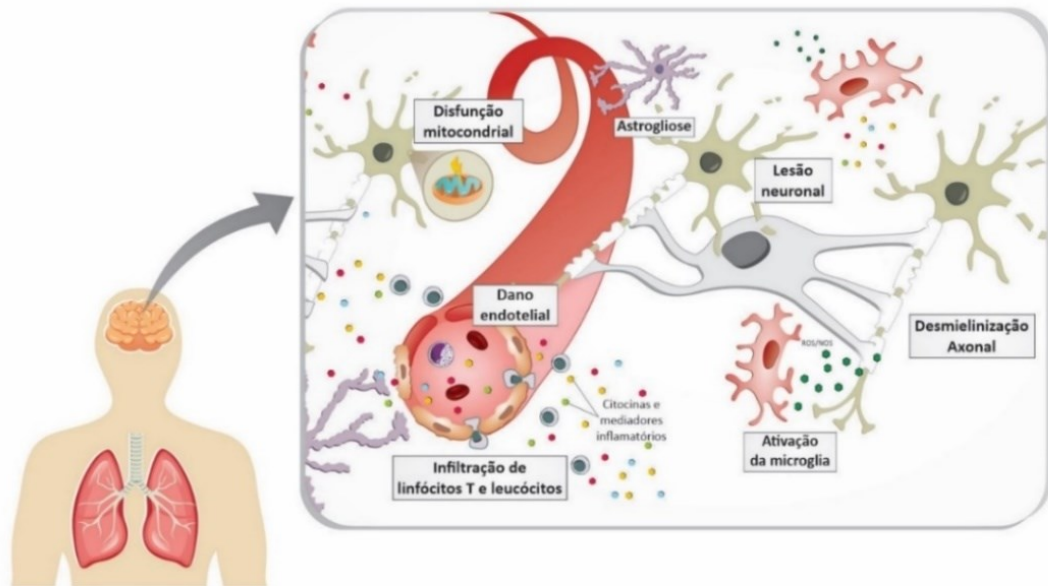
A neuroinflamação exacerbada no SNC leva à disfunções no sistema cerebrovascular, induzindo injúria significativa ao endotélio vascular, células e desequilíbrios em neurotransmissores, resultando em trombogênese e vasoconstrição anormal (PFISTER et al., 2008). Da mesma forma, o processo isquêmico exagera a neuroinflamação e aumenta a infiltração de células inflamatórias no SNC (MAEKAWA et al., 1991; PFISTER et al.; 2008).

Figura 4 – Sepses, inflamação sistêmica e disfunções no SNC



Legenda: A infecção ativa o sistema imunológico inato periférico, gerando mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e outros peptídeos ativados). A resposta inflamatória sistêmica, o dano às células endoteliais e migração de células imunológicas da periferia contribuem para o início da neuroinflamação, com liberação de citocinas pro-inflamatória. Células e moléculas inflamatórias atravessam a barreira hematoencefálica exercendo citotoxicidade neuronal direta e indireta. Além disso, poderá ocorrer lesão vascular (microtrombos), ativação microglial, astrogliose com consequente dano neuronal e desmielinização axonal. Manifestações clínicas à curto e a longo prazo estão associadas a disfunções no SNC relacionadas à sepsis. Fonte: Planejamento do esquema da figura de autoria própria, e ilustração realizada pela ilustradora Priscila B. Rosa pelo software CorelDraw e Mind the Graph, 2021.

Figura 5 – Possíveis mecanismos associados a disfunção do SNC na sepse



Legenda: A ativação da microglia e da astroglia produz aumento de mediadores inflamatórios e está associada ao comprometimento da integridade da BHE que permite a passagem de fatores neurotóxicos (citocinas, ROS, quimiocinas), resultando em neuroinflamação sustentada. As bainhas de mielina oligodendroglial podem ser afetadas levando à degeneração axonal. Disfunção mitocondrial e lesão neuronal também podem estar presentes. Fonte: Planejamento do esquema da figura de autoria própria, e ilustração realizada pela ilustradora Priscila B. Rosa pelo software CorelDraw e Mind the Graph, 2021.

## 1.4 MODELOS ANIMAIS DE SEPSE

### 1.4.1 Validação e translação de modelos animais de sepse

Geyer, Markou (2000) destacam a importância no desenvolvimento de modelos animais como reproduzir uma síndrome ou condição humana, em suas manifestações, ainda que se adaptando à complexidade de outras espécies; e mimetizar um conjunto de manifestações associadas a determinada patologia ou condição humana. Essas manifestações podem compreender o total dos fenômenos associados à sua ocorrência em humanos, apenas uma parte, ou ainda apenas comportamentos observáveis.

Neste sentido, a abordagem translacional visa colmatar as lacunas entre pesquisa animal básica e prática clínica. Uma abordagem robusta deve incluir pesquisas da bancada para a cabeceira (de animais para humanos, ou de pesquisa básica para clínica) mas também pesquisa de retrotradução (de humanos para animais). A abordagem de retrotradução é crucial ao tentar avaliar a função de alguns mecanismos descobertos em modelos animais na fisiopatologia de

doenças humanas e ao tentar descobrir tratamento para essas condições (ZERHOUNI, 2005; McARTHUR; BORSINI, 2008; BELZUNG; LEMOINE, 2011).

Para entender como os modelos são desenvolvidos, é preciso ter em mente o conceito de validade empregado. Dentre os tipos de critérios de validade, três foram propostos como de maior relevância para os modelos associados a transtornos psiquiátricos: validade de face (também denominada validade aparente), validade de construto e validade preditiva (WILLNER, 1984).

A validade de face diz respeito a quão bem um modelo animal pode mimetizar os sintomas de uma determinada condição clínica. Já a validade de construto está relacionada com a habilidade de um modelo reproduzir aspectos fisiopatológicos de determinada doença, ou seja, características que remetam aos aspectos biológicos da doença que se deseja reproduzir. E, finalmente, a validade preditiva remete à propriedade pela qual um modelo animal pode demonstrar, em animais, resposta, aos agentes terapêuticos para determinada condição em humanos (WILLNER, 1984).

Muitos estudos em modelos animais têm sido realizados a fim de elucidar os mecanismos responsáveis pela disfunção orgânica na sepse e sua alta mortalidade e morbidade, assim como o desenvolvimento de novos tratamentos (CAVAILLON; SINGER; SKIRECKI; 2020).

Porém, nas últimas três décadas, apesar de vários estudos experimentais, nenhuma droga foi comprovadamente eficaz para gerar alterações significativas nos desfechos clínicos em pacientes sépticos. Paralelamente, muitos pesquisadores têm alertado a comunidade científica sobre a perpetuação de estudos - seja em animais ou ensaios clínicos - que não modificam paradigmas subjacentes, como melhora em desfechos agudos como mortalidade e morbidade, assim como desfechos a longo prazo como transtornos psiquiátricos pós-sepse e qualidade de vida bem como a necessidade e importância da translação dos estudos (RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007; DYSON; SINGER, 2009; MANASI et al., 2020; CAVAILLON; SINGER; SKIRECKI, 2020).

Na esfera experimental - e especificamente da sepse - Cavaillon, Singer e Skirecki (2020) apontam que a utilização de modelos animais com poucas possibilidades translacionais têm reforçado a galeria de estudos destituídos da validade de face. Neste sentido, a fim de conferir maior robustez aos estudos experimentais de sepse, algumas pesquisas têm utilizado modelos geneticamente modificados com anticorpos ou drogas que têm como alvo uma determinada

molécula envolvida na infecção séptica, obtendo contribuições relevantes na área (CAVAILLON; SINGER; SKIRECKI, 2020).

No entanto, os ensaios clínicos não demonstraram resultados positivos compatíveis com os achados experimentais, provavelmente devido ao limitado valor preditivo dos modelos experimentais de sepse (RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007; DYSON; SINGER, 2009; PLENGE; SCOLNICK; ALTSHULER, 2013; CAVAILLON; SINGER; SKIRECKI, 2020).

Todavia, primeiramente é essencial reconhecer as diferenças significativas que existem entre murinos e humanos, não apenas em termos de fisiologia, mas também no que diz respeito à resposta a um insulto séptico (CAVAILLON, SINGER, SKIRECKI; 2020). Uma destas distinções, sem dúvida, é a resistência dos roedores à endotoxina e à infecção (WARREN et al., 2010; GENTILE et al.; 2013). Além disso, genes que codificam não só citocinas e quimiocinas, mas também proteínas que detectam PAMPs e DAMPs, não são estritamente idênticas (SEOK et al., 2013).

Outras diferenças interessantes também podem ser encontradas, como o fato de os murinos, ao contrário dos humanos, serem capazes de desenvolver bradipneia ao invés de taquipnéia, e bradicardia ao invés de taquicardia (ISKANDER et al., 2013; HOOVER et al., 2015). Desta forma, quando mantidos em temperatura ambiente, os camundongos sépticos estão sob estresse de baixas temperaturas, apresentando geralmente hipotermia, de acordo com a gravidade do insulto séptico (ZOLFAGHARI et al., 2013; KARP, 2012).

Os diferentes ritmos circadianos entre murinos e humanos também afetam a resposta imunológica e o tempo de expressão de seus principais reguladores (ZHAO et al., 2017). Nesta perspectiva, alguns autores demonstraram que o número de leucócitos circulantes apresenta oscilação diurna em humanos e roedores, mas seu pico ocorre à noite em humanos, e durante o dia em roedores (BORN et al., 1997; SCHEIERMANN et al., 2012).

Além disso, a ativação de células de defesa nos humanos é predominantemente neutrofílica, enquanto nos murinos é linfocitária, fato este que pode alterar a modulação do processo inflamatório na sepse (MESTAS; HUGHES, 2004).

Outro aspecto importante é que o modelo experimental de infecção influencia fortemente a resposta ao hospedeiro. Mecanismos subjacentes a resposta do hospedeiro são muito influenciados pela localização do insulto infeccioso, uma vez que as células imunológicas residem em vários microambientes moleculares e celulares em diferentes tecidos e, como consequência, apresentam comportamentos específicos. Um exemplo bastante esclarecedor deste

aspecto é a estimulação distinta que ocorre nos macrófagos peritoneais, alveolares e nos monócitos sanguíneos à presença de *Staphylococcus aureus* no organismo (KAPETANOVIC et al., 2011).

De fato, estudos em pacientes sépticos confirmam como os diferentes locais de infecção afetam a resposta sistêmica (GOGOS et al, 2010; HOSER et al, 2012). Assim, os mecanismos fisiopatológicos diferem entre os diferentes sítios de infecção, e a intervenção terapêutica deve ser adaptada de acordo com coortes de pacientes mais homogêneas em relação ao local da infecção (CAVAILLON; SINGER; SKIRECKI; 2020).

Portanto, a pesquisa experimental em sepse deve ser projetada, conduzida e relatada de forma a minimizar as várias formas de viés e, simultaneamente, maximizar seu potencial de reprodutibilidade. Sob esta premissa, a utilização de modelos animais padronizados pode eliminar algumas das diferenças entre os estudos em animais e humanos, permitindo um maior grau de translação nas pesquisas de sepse (CAVAILLON; SINGER; SKIRECKI, 2020).

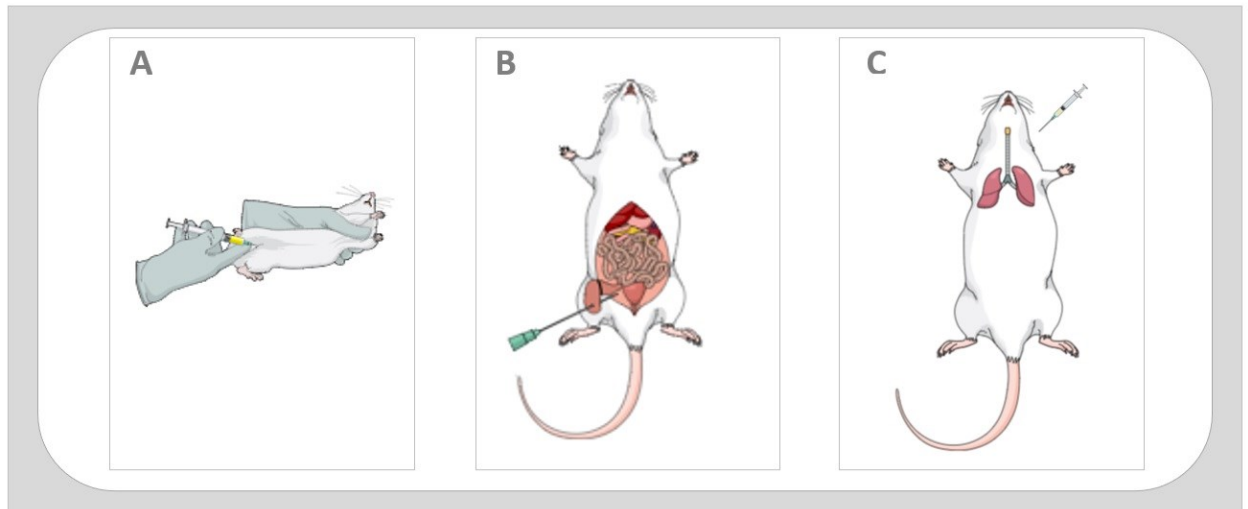
#### **1.4.2 Categorias de modelos de sepse relacionadas à alteração do SNC**

De maneira geral, os modelos de sepse podem ser divididos em três categorias: administração exógena de um patógeno viável (como bactérias); alteração da barreira protetora endógena do animal (alteração da permeabilidade do cólon, permitindo a translocação bacteriana), como CLP e a administração exógena de uma toxina (como LPS, endotoxinas ou zimosan), sendo essa última não considerada “modelo de sepse” para alguns autores (RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007, TUON et al., 2008; CALSAVARA et al., 2013).

O LPS é uma molécula derivada da membrana de bactérias gram negativas, sendo considerado como um dos principais fatores responsáveis pelas manifestações clínicas de infecção e inflamação sistêmicas. Não obstante, modelos experimentais que utilizam LPS apresentam fragilidades fisiopatológicas referentes à sepse, limitando sua utilização para este fim, a despeito de auxiliarem na determinação de perfis endotoxêmicos (RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007).

Dal-Pizzol et al. (2021), em uma revisão sistemática, demonstraram que os modelos mais utilizados para compreender os mecanismos atrelados a ansiedade, depressão e cognição a longo prazo em animais pós-sepse são LPS e CLP (Figura 6).

Figura 6 – Modelos de sepse



Legenda: Principais modelos de sepse associados à alterações no SNC a curto e longo prazo (A) LPS, (B) CLP, (C) pneumosepsis: modelo proposto com potencial translacional relacionado à disfunções no SNC (alterações em parâmetros comportamentais + neuroinflamação). Fonte: Planejamento do esquema da figura de autoria própria, e ilustração realizada utilizando o Mind the Graph, 2021.

No modelo CLP, na qual há uma simulação de peritonite e sepse de foco abdominal, os murinos são submetidos a uma laparotomia mediana e à uma ligadura do ceco, logo abaixo da válvula íleo cecal, com perfuração do ceco de tamanho padronizado e, desta maneira, com liberação de conteúdo fecal para a cavidade peritoneal, conforme classicamente descrito por Wichterman e colaboradores (1980).

Uma desvantagem deste modelo é a grande variabilidade na gravidade da sepse induzida, pois o procedimento pode variar dependendo de fatores como as práticas assépticas adotadas, o protocolo de ressuscitação, o local da ligadura, o número de punções e o tamanho da agulha utilizada (DEJAGER et al., 2011). Estes aspectos técnicos podem levar a limitações na reprodutibilidade e generalizações deste modelo (LEWIS; SEYMOUR; ROSENGART, 2016; LAUKENS et al., 2016).

Além disso, fatores intrínsecos como a dieta dos animais e a composição microbiológica do ceco também podem afetar a gravidade da sepse neste modelo, resultando em desfechos experimentais distintos (LAUKENS et al., 2016).

Apesar das dificuldades apontadas, este modelo induz alterações inflamatórias, imunológicas, hemodinâmicas e bioquímicas muito semelhantes àquelas observadas na sepse humana. Em comparação com a administração de endotoxinas, o modelo de CLP induz a um



aumento mais lento, porém mais consistente nos níveis das citocinas plasmáticas, que mais se assemelha à condição humana (DEJAGER et al., 2011).

Em relação as disfunções no SNC, o modelo de CLP pode impactar por meio de ativação microglial e neuroinflamação (MICHELS et al., 2015), e também tem sido estudado em relação as alterações cognitivas e comportamentos tipo-depressivo e ansioso (TUON et al., 2008; CALSAVARA et al., 2013, DAL-PIZZOL et al., 2021).

Já a pneumosepse, é uma alternativa vantajosa, pois a infecção primária pode ser entregue em um inóculo padronizado com um patógeno específico (DENSTAEDT et al., 2019). Além disso, quando originária de bactérias gram-negativas, este modelo apresenta um forte paralelo aos casos de sepse humana, correspondendo a mais da metade dos casos registrados (ANGUS; POLL, 2013). Nesse sentido, estes modelos exibem potencial translacional significativo.

A pneumosepse consiste na instilação de bactérias via intratraqueal ou nasal em determinada concentração (SORDI et al., 2013; HOREWICZ et al., 2015, SOARES et al.; 2016; GONÇALVES et al., 2017; DENSTAEDT et al., 2019; PROBST et al. 2019; SUMAR et al., 2021).

Neste contexto, o modelo de pneumosepse com instilação de bactérias como *Klebsiella Pneumoniae*, também pode ser uma ferramenta útil para estudar alterações cognitivas e comportamentos tipo-depressivo e ansioso após sepse, tanto a curto como a longo prazo, bem como os mecanismos associados à recuperação desses distúrbios (PROBST et al., 2019; SUMAR et al., 2021).

Além disso, o decurso temporal dos eventos fisiopatológicos neste modelo é muito mais lento que em outros modelos experimentais, favorecendo uma maior janela de trabalho para o pesquisador (SORDI et al, 2013; GONÇALVES et al., 2017). Outra vantagem do modelo de pneumosepse é que a mortalidade se correlaciona com o número de unidades formadoras de colônia (UFC) inoculados, estabelecendo graus e gravidade UFC-dependente, de acordo com o objetivo do pesquisador, e mimetizando aspectos clínicos importantes da sepse (SORDI et. al, 2013; SOARES et. al.; 2016; GONÇALVES et al., 2017; PROBST et al., 2019; SUMAR et al., 2021).

Apesar de apresentar uma marcante característica translacional, o modelo de pneumosepse ainda não foi relacionado à processos patológicos neurológicos, bem como à disfunções comportamentais a curto e longo prazo.

Dessa maneira, cada modelo de sepse tem vantagens e desvantagens, como sumarizado na tabela abaixo:

Quadro 1 – Principais modelos de sepse: vantagens e desvantagens

<b>Modelos de Sepse</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>CLP</b>	Reproduz um foco infeccioso	Variabilidade na gravidade da sepse (tamanho da agulha, número de perfurações, habilidade técnica).
	Modelo de sepse polimicrobiana utilizando amplo espectro de bactérias entéricas	Alta mortalidade
	Liberação de citocinas de maneira prolongada e persistente	Pode produzir abscessos
	Disfunção cognitiva e alterações comportamentais consistentes em períodos mais tardios	Comportamentos tipo-depressivo, ansioso e cognição não podem ser avaliados no início devido a severa limitação de movimento após cirurgia
<b>LPS</b>	Simple e reprodutível	Dose e via de administração podem variar
	Induz um processo inflamatório agudo	Abordagem translacional limitada
	As alterações comportamentais e cognitivas podem ser avaliadas nos primeiros dias devido a menor limitação de movimento	Citocinas aumentam de maneira aguda e não perduram por longos períodos
		A sinalização é mediada exclusivamente por TLR-4
As alterações comportamentais não se mantem a longo prazo		
<b>Pneumosepse</b>	Abordagem translacional importante	Cultivo da bactéria (expansão)
	Reprodutível e padronizado	Cuidados com biossegurança (risco 2)
	Concentrações bacterianas estão associadas à gravidade e mortalidade	
	As alterações comportamentais e cognitivas podem ser avaliadas a curto e longo prazo	

Fonte: RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007; TUON et al., 2008; DEJAGER et al., 2011; CALSAVARA et al., 2013, LAUKENS et al., 2016; DENSTAEDT et al., 2019; DAL-PIZZOL et al., 2021

## 2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, estima-se uma incidência de aproximadamente 49 milhões de casos de sepse por ano no mundo, com altas taxas de mortalidade e morbidade (RUDD et al., 2020). A sepse é considerada um problema de saúde pública devido a seus números crescentes de casos, mas especialmente, em virtude de sequelas debilitantes persistentes a curto e a longo prazo nos pacientes sépticos sobreviventes, assim como custos financeiros elevados para o sistema de saúde (LEE et al., 2004; FINFER et al., 2013; FLEISCHMANN et al., 2016). Ainda que o início da sepse seja agudo e represente uma alta mortalidade à curto prazo, esta síndrome também pode ser a causa de morbidade significativa, demandando tratamento e suporte que se prolongam muito além da alta hospitalar, com sequelas devastadoras que diminuem, drasticamente, a qualidade de vida do paciente acometido (PRESCOTT; ANGUS, 2018a; RUDD et al., 2020).

As sequelas a longo prazo relacionadas à sepse podem abarcar desde distúrbios de natureza imunometabólica, física e funcional até àqueles de ordem neurocognitiva e psiquiátrica (IWASHYNA et al., 2010; PRESCOTT, ANGUS, 2018b; MOSTEL et al., 2019; CAVAILLON; SINGER; SKIRECKI, 2020). O conjunto destas complicações que podem acometer o indivíduo pós sepse é conhecido como síndrome pós-sepse, uma entidade de importância recém-descoberta (MOSTEL et al., 2019).

Em relação as disfunções relacionadas ao SNC, muitas pesquisas têm sugerido consequências tanto à curto como longo prazo. Sob esta perspectiva, alguns estudos têm indicado que a incidência de transtornos agudos, como encefalopatia séptica, bem como a alta prevalência de disfunções psiquiátricas - como ansiedade, transtorno depressivo maior, TEPT, e déficits cognitivos - são muito comuns após o evento séptico (NIKAYIN et al., 2016; MOSTEL et al., 2019).

Devido ao incremento substancial no desfecho relativo à sobrevivência em pacientes com sepse no ambiente hospitalar, as pesquisas têm sido cada vez mais direcionadas às consequências debilitantes que podem ocorrer tanto durante como após o evento séptico (MOSTEL et al., 2019).

Várias frentes de estudo que incluem ciência básica, ensaios clínicos e estudos epidemiológicos contribuíram de maneira significativa sobre o conhecimento sobre a sepse (CAVAILLON; SINGER; SKIRECKI, 2020). Não obstante, muitos destes avanços científicos ainda não se traduziram no desenvolvimento de novos alvos de tratamentos e terapias eficazes,

ratificando a complexidade, abrangência e heterogeneidade da síndrome séptica (CAVAILLON; SINGER; SKIRECKI, 2020).

Um aspecto que deve ser considerado durante a concepção de modelos experimentais na sepse está relacionado ao sítio primário da infecção. De fato, os pulmões constituem-se em um dos locais mais comuns de acometimento e desenvolvimento da infecção bacteriana, representando cerca de 50% de todas as fontes de infecção (SILVA et al., 2012; ALBERTI et al., 2002; SAKR et al., 2018). Esta adequação do modelo animal pode pontuar com melhor acurácia os eventos fisiopatológicos secundários à infecção, potencializando o direcionamento do tratamento (CAVAILLON; SINGER; SKIRECKI, 2020).

Diante do desafio imposto pela natureza multifacetada da sepse, os estudos experimentais nesta seara têm alterado seu paradigma, a fim de tangenciar aspectos translacionais que realmente reflitam a doença à beira do leito.

Munidos de concepção e abordagens mais clínicas, somadas a uma compreensão expandida da fisiopatologia mecanística da sepse, os objetivos da pesquisa básica também têm abordado escopos relacionados às múltiplas disfunções (físicas, funcionais e neurológicas, incluindo alterações psicológicas e cognitivas), que podem ser permanentes no paciente séptico (TINETTI; NAIK; DODSON, 2016). Neste sentido, estudos que tenham hipóteses que podem ser testadas em modelos animais relevantes a curto e a longo prazo são necessários (EFRON et al., 2015). Estudos envolvendo modelos animais têm avançado consideravelmente em relação ao conhecimento da complexa interação entre neuroinflamação e distúrbios neuropsiquiátricos e cognitivos na sepse, apoiando o quadro clínico e a melhor compreensão das comorbidades pós insulto séptico a curto e longo prazo (CALSAVARA et al., 2013; BARICHELLO, et al., 2019; SAVI et al., 2021).

Porém, apesar da relevância dos achados, o modelo experimental de CLP é um dos mais utilizado para a investigação de aspectos neuroinflamatórios e comportamentais na sepse. Apesar da principal causa de sepse no mundo ser a pneumonia (ALBERTI et al., 2002; SAKR et al., 2018), existem poucos estudos que abordam a sepse de origem pulmonar e suas repercussões comportamentais e neuroinflamatórias que tenham abordagens translacionais relevantes, bem como com validades de face, constructo e preditiva bem estabelecidas.

Dessa maneira, modelos com forte potencial translacional tal como pneumosepse induzida por bactérias não tem sido explorada sob este aspecto.

Esta tese objetivou caracterizar parâmetros comportamentais relacionado à aspectos cognitivo (memória) e de comportamentos tipo-depressivo e ansioso , assim como a neuroinflamação, em animais submetidos à sepse de origem pulmonar, utilizando um modelo com uma abordagem translacional significativa, justificando seu ineditismo e importância científica. Adicionalmente, o desenvolvimento desta pesquisa amplia e agrega novas descobertas que podem sustentar a complexidade das disfunções psiquiátricas e cognitivas no SNC na população de pacientes sobreviventes à sepse, reforçando sua importância clínica.

Desta maneira, a hipótese desse estudo foi que a sepse de origem pulmonar induzida por *Klebsiella pneumoniae* desencadeia neuroinflamação como níveis elevados de citocinas no SNC, com consequente alterações comportamentais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as repercussões sistêmicas, os parâmetros comportamentais e neuroinflamatórios em camundongos com pneumosepse induzida por instilação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar, temporalmente, o modelo experimental de pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae*, avaliando os desfechos de mortalidade, perfil hematológico, disseminação bacteriana sistêmica e encefálica, lesão orgânica (função renal), escore clínico e bem-estar animal, bem como o peso corporal e consumo alimentar (água e ração) de camundongos da linhagem Swiss;

- Avaliar, temporalmente, o comportamento cognitivo-emocional (comportamentos tipo-depressivo, ansioso e memória) em camundongos Swiss com pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae*;

- Quantificar, temporalmente, a ação neutrofílica no pulmão, hipocampo e córtex pré-frontal, por meio da atividade da mieloperoxidase em camundongos com pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae*;

- Avaliar temporalmente, a permeabilidade da barreira hematoencefálica no hipocampo, córtex pré-frontal e medula, assim como a permeabilidade vascular no pulmão, intestino grosso, rins, fígado, coração em camundongos com pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae*;

- Quantificar, temporalmente, as concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no pulmão, hipocampo e córtex pré-frontal em camundongos com pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae*;

- Correlacionar temporalmente os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 aos comportamentos tipo-ansioso e depressivo observados em camundongos com pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae*;

- Avaliar, temporalmente, a ativação microglial no hipocampo em camundongos com pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Este trabalho é caracterizado como um estudo experimental, randomizado. Foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o protocolo 8919250219. Os experimentos estão certificados pelas diretrizes do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e os animais foram submetidos ao tratamento de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e também receberam os cuidados de acordo com a Diretiva da União Europeia 2010/63/UE e diretrizes do guia “Animal Research: Reporting *In Vivo* Experiments” (ARRIVE) (KILKENNY *et al*, 2010; PERCIE DU SERT *et al*, 2020).

### 4.2 ANIMAIS E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

Foram utilizados 298 camundongos machos da linhagem Swiss, adultos jovens, com idade entre 6-8 semanas, pesando aproximadamente 30-40 g. Os animais foram obtidos do biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC e mantidos no biotério setorial do Laboratório da Neurobiologia da Dor e Inflamação da Universidade Federal de Santa Catarina (LANDI/UFSC) ambientados a  $22 \pm 2$  °C, em um ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso à água filtrada e ração “*ad libitum*”.

Os animais permaneceram em caixas padrão de polipropileno (30x20x13cm), sendo quatro camundongos por caixa. As caixas foram mantidas em estante ventilada e com sistema de mini isoladores (ALESCO®). Esse sistema fornece melhor qualidade de vida e proteção aos animais, uma vez que a circulação do ar vinculada injeta o ar diretamente no mini-isolador, em fluxo contínuo e de baixa velocidade, garantindo uma troca de ar mais adequada. Todas as caixas foram limpas e trocadas pelo menos três vezes por semana. A cada troca de caixa foi avaliada a necessidade de repor a ração industrial e sempre houve o cuidado de manter o local limpo e evitar contaminação.

### 4.3 MODELO EXPERIMENTAL DE PNEUMOSEPSE

A bactéria utilizada neste protocolo experimental foi a *Klebsiella pneumoniae* (*K.p*) (ATCC 700603 – American Type Culture Collection, Rockville, MD). As alíquotas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Óxido Nítrico, do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### 4.3.1 Expansão e quantificação da bactéria

Alíquotas de 500 µL da bactéria liofilizada foram suspensas em 40 mL de caldo Brain-Heart Infusion (BHI) em tubo plástico e incubadas a 37°C por 18 horas. Após a incubação, o conteúdo foi centrifugado a 2.500 g por 15 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o conteúdo foi novamente suspenso em 30 mL de solução tampão fosfatada (PBS) para lavagem das bactérias. Após duas lavagens, o sedimento resultante foi ressuspenso com auxílio de um agitador de tubos tipo Vórtex, e colocado em microtubos. Diluições seriadas (com um fator de 10), então, foram realizadas, e a densidade óptica foi determinada a 600 nm. Para a quantificação das bactérias, 10 µL das diluições foram plaqueadas em duplicata, em condição estéril, em ágar Mueller-Hinton, e incubadas a 37°C, por 24 horas, a fim de determinar o número de unidades formadoras de colônia (UFC). Com a finalidade de relacionar a densidade óptica e UFC/mL, foi realizada uma regressão linear, resultando, desta forma, no número de UFC de todas as alíquotas utilizadas a partir deste lote específico de bactérias (SORDI et al., 2013).

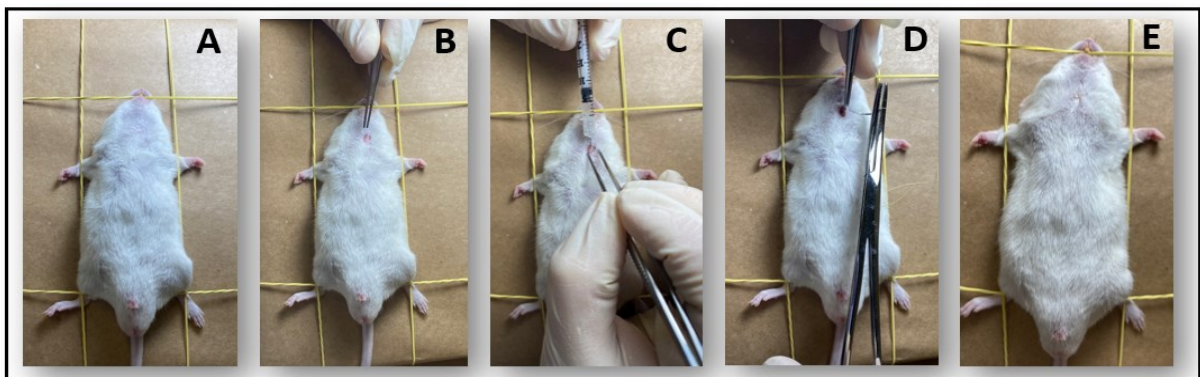
#### 4.3.2 Inoculação de *Klebsiella pneumoniae* em camundongos

Alíquotas individuais de *Klebsiella pneumoniae* foram descongeladas diluídas em PBS na concentração de  $5,9 \times 10^9$  UFC/ animal de *Klebsiella pneumoniae* para inoculação intratraqueal. Os animais, então, foram anestesiados com quetamina (0,04 mL/Kg) e xilazina (0,1mL/Kg). Realizou-se a verificação do estado de consciência animal, observando-se a ausência de resposta motora ao pinçamento da cauda e pregas interdigitais, e em seguida, os animais foram colocados em posição supina, com inclinação de 45°, para a realização de uma incisão de 5 mm na pele, na região ventral do pescoço. A musculatura foi suavemente afastada, com a identificação da traqueia, onde foi injetada uma solução de 0,05 mL da suspensão de



bactérias (Figura 7). Após o procedimento, a pele foi suturada e os animais receberam 30 mL/Kg de PBS na região dorsal, em meio subcutâneo, para reposição fluídica, permanecendo em ambiente aquecido (caixas) até a recuperação cirúrgica. Os animais do grupo controle (falso-inoculado) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, porém com instilação intratraqueal de 0,05 mL de PBS (SORDI et al., 2013).

Figura 7 – Procedimento cirúrgico de pneumosepse



Legenda: Etapas do procedimento cirúrgico para indução da pneumosepse. A: animal em posição supina inclinada (45°C); B: Incisão de 5 mm da pele na região ventral do pescoço, com afastamento da musculatura e visualização da traqueia. C: injeção de 0,05 mL da suspensão de bactérias ou de PBS; D e E: sutura cirúrgica com ponto único. Fonte: da autora, 2021.

#### 4.3.3 Biossegurança

Os riscos biológicos ocorrem por meio de microorganismos que, em contato com o homem, podem provocar inúmeras doenças. Muitas atividades profissionais favorecem o contato com tais riscos sendo o caso de laboratórios de pesquisa, por exemplo (ODA et al., 1998).

São considerados riscos biológicos: vírus, bactérias, parasitas, protozoários, fungos e bacilos. Os riscos biológicos em laboratórios podem estar relacionados com a manipulação de agentes patogênicos selvagens, agentes patogênicos atenuados, agentes patogênicos que sofreram processo de recombinação, amostras biológicas, culturas e manipulações celulares (transfecção, infecção) (ODA et al., 1998). De acordo com o Ministério da Saúde (2004), as classificações existentes dividem os agentes patogênicos em quatro classes, que variam de 1 (sem risco de contágio para o manipulador e comunidade) a 4 (risco grave para o manipulador e comunidade). Os riscos biológicos que se associam a manipulação da bactéria utilizada nesta pesquisa classificam-se como classe 2, na qual o agente (*Klebsiella pneumoniae*) apresenta risco

moderado para o manipulador e potencial de contágio fraco para a comunidade. Não obstante para este caso, há sempre tratamento preventivo.

Dessa maneira, foram realizadas medidas preventivas para que as condições de higiene e segurança no laboratório fossem adequadas (ODA et al., 1998), tais como:

- Conhecimento da legislação brasileira de biossegurança;
- O conhecimento dos riscos biológicos pelo manipulador;
- O respeito às regras gerais de segurança e medidas de proteção individual;
- Medidas de proteção individual, como uso do avental, luvas, máscara e demais equipamentos de proteção individual necessários;
- Utilização da capela de fluxo laminar corretamente, mantendo-a higienizada antes e após cada procedimento;
- Utilização de desinfetante apropriado para inativação do agente utilizado.

#### 4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Neste estudo, os animais foram randomizados aleatoriamente em grupos (pnemosepse e falso-inoculado) e foram realizados quatro protocolos experimentais (cujo detalhamento está especificado na Figura 8 e na Tabela 2), conforme a descrição a seguir.

No **experimento I A** foi realizada a padronização do modelo experimental de pneumosepse, com a finalidade de determinar a quantidade de UFC de *Klebsiella pneumoniae* suficiente para ocasionar um processo séptico nos animais. Desta maneira, foram realizados experimentos seriados nos quais foram inoculadas concentrações diferentes da bactéria, e a sobrevivência destes animais foi acompanhada a cada 24 horas ao longo de 10 dias. Os animais falsos inoculados foram utilizados como controle experimental. Na Tabela 2 estão os números de animais utilizados em cada experimento.

No **experimento II A** foi realizada a quantificação da disseminação bacteriana sistêmica, mais especificamente no sangue e encéfalo. Grupos de animais receberam instilação de *Klebsiella pneumoniae* e foram avaliados 24h, 48h, 72h e 7 dias após a indução de pneumosepse. Nesta etapa experimental, os camundongos também foram avaliados de acordo com o escore clínico (GONÇALVES et al., 2017; SUMAR et al., 2020).

No **experimento II B** foi realizada a análise dos níveis urinários de ureia e creatinina 24h após a indução da lesão, a fim de identificar comprometimento orgânico distal, característico da sepse.

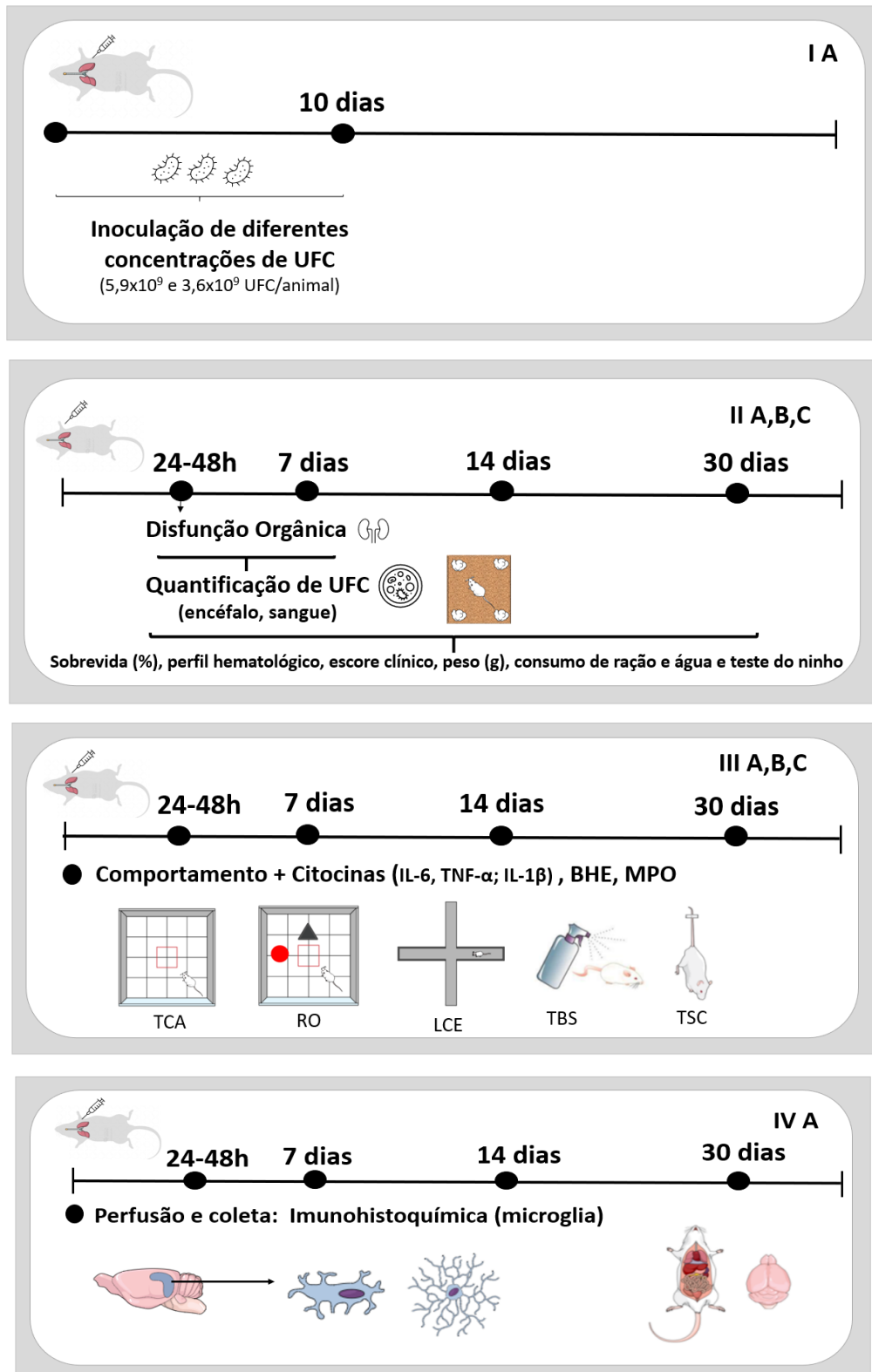
Além disso, **no experimento II C** também foram avaliados peso corporal, quantidade de ração consumida e volume de água ingerida, durante 30 dias; adicionalmente, foi realizado o teste do ninho (para verificação do bem-estar animal).

Já no **experimento III A**, foram realizados os testes comportamentais temporais, tanto a curto (48-72h, 7 dias) como a longo prazo (14 e 30 dias), após a indução séptica destinados a avaliar o efeito da pneumosepse sobre parâmetros comportamentais exploratórios, tipo - depressivo e ansioso e memória. Para tanto, foram utilizados os testes de campo aberto (TCA), labirinto em cruz elevado (LCE), teste de suspensão pela cauda (TSC), teste de borrifagem de sacarose (TBS) e reconhecimento de objeto (RO), respectivamente. Destaca-se que o uso de diferentes grupos de animais foi necessário para evitar a habituação dos animais aos testes, e eventual ocorrências de vieses. Apenas à título de esclarecimento, a habituação pode ser definida como um decréscimo da resposta comportamental resultante da estimulação repetida, que não envolve adaptação ou fadiga sensorial, ou mesmo fadiga motora (RANKIN et al., 2009). Desta maneira, neste protocolo experimental, nenhum animal repetiu o mesmo teste ao longo do tempo.

Adicionalmente, no **experimento III B** foi avaliado também o perfil inflamatório temporal (48-72h, 7, 14 e 30 dias) dos animais, que incluiu a atividade da mieloperoxidase, a avaliação da permeabilidade vascular tecidual e da BHE e quantificação dos níveis de citocinas, nos pulmões, hipocampo e córtex pré-frontal após a indução da pneumosepse.

Finalmente, no **experimento IV A**, foram coletadas amostras de encéfalos nos períodos de 48-72 h, 7, 14 e 30 dias após a indução da pneumosepse, a fim de avaliar a ativação microglial no hipocampo, por meio de análise imunohistoquímica.

Figura 8 - Protocolos experimentais



Legenda: Protocolos experimentais. Experimentos I, II, III e IV. UFC: unidades formadoras de colônia, MPO: mieloperoxidase, TCA: teste do campo aberto, RNO: reconhecimento de novo objeto, LCE: labirinto em cruz elevada, TBS: teste de borrifagem de sacarose, TSC: teste de suspensão pela cauda. Fonte: Planejamento do esquema da figura de autoria própria, e ilustração realizada por meio da utilização do Mind the Graph, 2021.

Tabela 2 - Delineamento dos protocolos experimentais e números de animais utilizados

<b>Duração do Experimento</b>	<b>Descrição Experimental</b>	<b>Número de animais</b>
<b>Experimento I</b> <b>10 dias</b>	A. Identificação da quantificação de bactéria necessária (UFC)	n = 30
<b>Experimento II</b> <b>30 dias</b>	A. Quantificação de UFC no sangue e tecidos encefálicos e escore clínico	n = 40
	B. Lesão orgânica distal ao sítio da lesão (creatinina e ureia - 24 horas)	n = 16
	C. Consumo (ração, água) e bem-estar animal	n = 20
<b>Experimento III</b> <b>30 dias</b>	A. Avaliação Comportamental	
	Grupo 1	n = 20
	Grupo 2	n = 20
	Grupo 3	n = 20
	Grupo 4	n = 20
	B. Coleta de tecidos pulmonar e encefálico (citocinas e MPO) Coleta de tecidos (Permeabilidade vascular e BHE)	n = 64
<b>Experimento IV</b> <b>30 dias</b>	A. Coleta do encéfalo (hipocampo): (Avaliação da ativação microglial por imunohistoquímica)	n = 48

#### 4.5 ESCORE CLÍNICO

Alguns parâmetros também foram observados para avaliar o escore clínico na sepse de forma temporal, realizado de acordo com os parâmetros descritos por Shaver e Hauser (2004) e adaptada por Machado e colaboradores, (2010), Gonçalves e colaboradores, (2017), Sumar e colaboradores (2020). Os escores mais altos refletem a gravidade da sepse, e estão associados à mortalidade e disseminação bacteriana (GONÇALVES et al., 2017). Nesta avaliação, cada animal recebeu uma pontuação total que variava entre 0 (completamente “saudável”) a 6 (moribundo). Neste estudo, os animais foram observados durante 30 dias em relação às características descritas no Quadro 2, a saber :

Quadro 2 - Escore clínico

<b>Características</b>	<b>Escore</b>			<b>Total</b>
Aparência	0 = pelos lisos	1 = pelos arrepiados		
Aspectos dos olhos	0 = normal	1 = com secreção		
Consciência	0 = alerta	1 = sonolento		
Respiração	0 = rápida normal	1 = lenta laboriosa		
Atividade	0 = ativo	1 = letárgico	2 = moribundo	

#### 4.6. PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR

O peso dos animais, assim como o consumo de ração e água foram verificados durante 30 dias (a cada 2 dias). Para a avaliação do peso foi utilizada a balança digital CK 1253 Fernet. Como os animais permaneceram alojados em caixas (4-5 animais), foi realizado a média de consumo de água e ração por animal/caixa.

## 4.7 TESTES COMPORTAMENTAIS

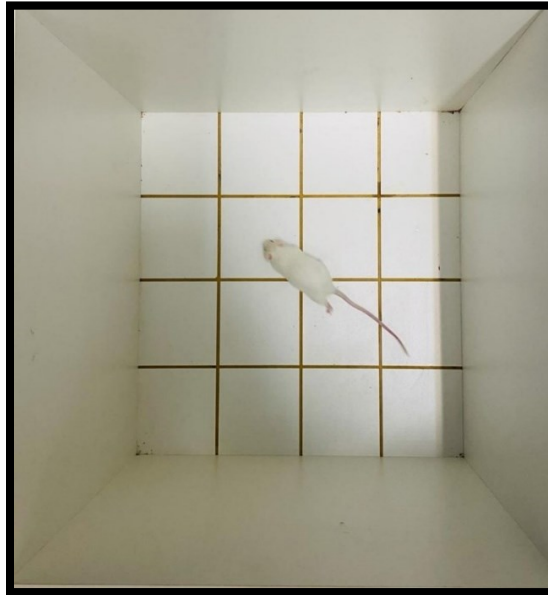
Os testes comportamentais foram avaliados nas fases inicial (48-72 h e 7 dias) e tardia (14 e 30 dias) após a indução da pneumosepse, como descrito anteriormente.

Os testes foram filmados e os parâmetros comportamentais analisados. A fim de não comprometer a fidelidade na execução dos testes, foram adotadas medidas de controle, tais como: iluminação menos aversiva, isolamento acústico para minimizar os ruídos, ambientação à sala de experimentação (durante 1 hora, antes do início das avaliações) e limpeza dos aparatos utilizados, com papel toalha e solução de álcool 10%. O experimentador monitorou externamente os testes, permanecendo em uma sala anexa. Os vídeos foram identificados com letras e números para permitir a avaliação de forma “cega”.

### 4.7.1 Teste do Campo Aberto

Para avaliação da atividade locomotora e comportamento exploratório geral foi utilizado o teste de campo aberto (Figura 9). De acordo com Prut e Belzung (2003), a tendência natural do animal em um ambiente novo é explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado pelo meio no qual foi recém colocado. O aparato consiste em uma arena aberta, de madeira lisa, com uma área quadrada de 40 cm × 60 cm × 50 cm, e fundo da caixa dividido em 16 quadrados iguais. Os 4 quadrados centrais são considerados como centro do campo aberto, e os 12 quadrados laterais como a parte marginal. Nas etapas experimentais pré-determinadas, os animais foram posicionados no centro do aparato, permitindo-lhes livre exploração ambiental durante 5 minutos, no quais foram avaliados O número total de cruzamentos, o tempo no centro do aparato (segundos) e porcentagem de cruzamentos no centro (%) (PRUT; BELZUNG, 2003).

Figura 9 - Teste de campo aberto



Fonte: da autora, 2021.

#### 4.7.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O teste de labirinto em cruz elevado foi realizado conforme proposto por Pellow e colaboradores (1985), com modificações. Este teste representa um importante instrumento de pesquisa na área experimental para estudos de comportamentos relacionados à ansiedade, em especial na análise do efeito farmacológico de novas drogas (PELLOW et al., 1985).

Este teste baseia-se no conhecimento prévio de que roedores, habitualmente, evitam locais abertos. Quando expostos à este tipo de ambiente, demonstram sinais característicos de como congelamento, defecação e micção, assim como o aumento da concentração plasmática de corticosterona. De forma geral, o roedor explora ambos os braços, abertos e fechados, mas tipicamente entrará com maior frequência e permanecerá por mais tempo nos braços fechados. Portanto, um dos sinais de ansiedade do animal relaciona-se a uma menor preferência pelas regiões com braços abertos (PELLOW et al., 1985).

O aparato consiste, basicamente, de um aparelho elevado a 60 cm do chão, com dois braços abertos (ambos com dimensões de 25 cm x 5 cm), um em frente ao outro, estando em posição perpendicular a dois braços fechados (25 cm x 5 cm x 15 cm) sobre uma plataforma central (5 cm x 5 cm) (Figura 10). Neste protocolo experimental, cada animal foi colocado



cuidadosamente na plataforma central do labirinto, de frente para um braço aberto, sendo observado durante 5 minutos, por meio de uma câmera de vídeo. Cada entrada em um braço (aberto ou fechado) foi registrada somente quando as quatro patas do animal estavam totalmente no interior do mesmo braço.

Desta maneira, os seguintes parâmetros foram analisados: o número de entradas nos braços abertos e fechados, bem como o tempo de permanência em cada um deles. Estes dados foram utilizados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos [%EA= entradas nos braços abertos/(entrada nos braços abertos + entradas nos braços fechados)] e o percentual de permanência nos braços abertos [%TA: tempo nos braços abertos/(tempo nos braços abertos + tempo nos braços fechados)]. Adicionalmente, foi utilizado o número total de entradas nos braços fechados como uma medida de locomoção.

Figura 10 - Labirinto em Cruz Elevado



Fonte: da autora, 2021.

#### 4.7.3 Teste do Ninho

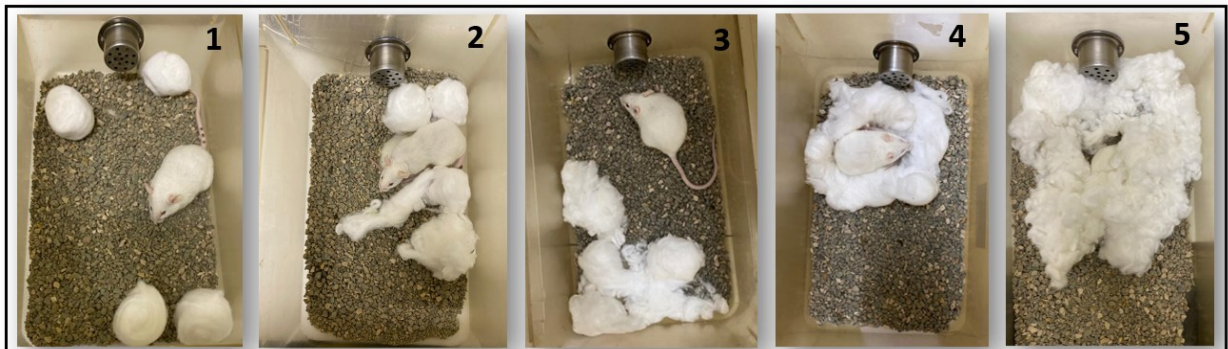
O teste do ninho foi realizado conforme protocolo descrito por Deacon (2006), com pequenas modificações. Sabe-se que o comportamento de construir ninhos é inato para roedores, tanto fêmeas quanto machos, principalmente, por questões reprodutivas, mas também para

manter o corpo aquecido e como abrigo (fuga de predadores), podendo, inclusive, indicar o bem-estar dos animais (GASKILL et al., 2013).

Neste protocolo experimental, aproximadamente 1 hora antes do início do ciclo escuro, os animais foram dispostos individualmente em caixas contendo um fundo sólido (granulado sanitário inodoro) e tufo de algodão (4 flocos, de 2,5 g cada, com dimensões de 5x7 cm) para a formação dos ninhos. Após uma 12 horas, uma fotografia de cada caixa foi realizada, a fim de contabilizar o escore (Figura 11). Dessa maneira, a avaliação da construção de ninhos foi considerada no tempo 12 horas, seguindo a pontuação (de 1-5) descrita abaixo:

- 1 - O algodão permaneceu intocado (> 90% intacto);
- 2 - O algodão foi parcialmente desfiado (aproximadamente 50% - 90% permanece intacto);
- 3 - O algodão foi desfiado (< 50%) , mas não ocorreu a construção do ninho;
- 4 - Há a construção de um ninho (> 90% do algodão desfiado), porém a construção ainda é plana;
- 5- Ninho formado, possui “paredes” que podem cobrir totalmente o animal.

Figura 11 – Avaliação da construção do ninho



Legenda: Teste do ninho. Avaliação da construção do ninho e pontuação, que varia de 1 a 5. Fonte: da autora, 2021.

#### 4.7.4 Teste de suspensão pela cauda

O teste da suspensão pela cauda foi desenvolvido por Steru e colaboradores (1985), baseado no fato de que um animal submetido a uma situação de estresse inevitável e inescapável apresentaria dois tipos de comportamentos alternados: a agitação, característica da tentativa de escape da situação e, por outro lado, a imobilidade, ou seja, com ausência de movimentos de

fuga. Este padrão de comportamento também pode ser chamado de “*searching-behavior*”, caracterizado pela alternância de intensa atividade motora e gasto de energia com a imobilidade (STERU et al., 1985).

A duração da imobilidade é inferida, neste teste, como um índice de “desespero comportamental” ou “desesperança”, que é um sintoma presente em humanos com depressão. Neste caso, longas durações de imobilidade implicariam em maiores graus do comportamento tipo-depressivo, com ausência de movimentos de fuga e, até mesmo, de balanços passivos do corpo (STERU et al., 1985; JUSZCZAK et al., 2006).

Desta forma, neste estudo, os camundongos foram colocados em uma sala visualmente isolada e com controle de ruídos. Cada animal foi suspenso e fixado a uma mesa a 50 cm do chão por meio de fita adesiva colocada na ponta da cauda (Figura 12). A filmadora foi posicionada na frente dos animais, as imagens foram gravadas e registradas durante 6 minutos e posteriormente foi contabilizado o tempo de imobilidade (segundos) e a latência para a imobilidade (segundos) durante esse período.

Figura 12 - Teste de suspensão pela cauda



Fonte: da autora, 2021.

#### 4.7.5 Teste da borrifagem da sacarose

Este teste foi aplicado de acordo com o protocolo descrito por Isingrini e colaboradores, (2010), com pequenas modificações. Resumidamente, no aspecto prático, trata-se do borrifo de 1 mL de solução de sacarose a 10% no dorso dos camundongos, que permaneceram isolados em caixas de acrílico (de dimensão 30 x 30 x 20 cm) durante a avaliação comportamental.

O princípio deste teste fundamenta-se no fato de que, devido à sua viscosidade, a solução de sacarose “adere” ao pelo do animal, induzindo um comportamento de limpeza (também conhecido como “*grooming*”) (Figura 13). Após a aplicação da solução de sacarose, a frequência (duração) e a latência para o início do comportamento de *grooming* foram observadas durante 5 minutos. Os indícios de falta de autocuidado e comportamento motivacional são considerados como paralelos a alguns sintomas de depressão em humanos (WILLNER, 2005). As caixas de acrílico foram higienizadas com solução de etanol a 10% entre cada avaliação, a fim de eliminar quaisquer pistas olfativas prévias.

Figura 13 - Teste de borrifagem de sacarose



Fonte: da autora, 2021.

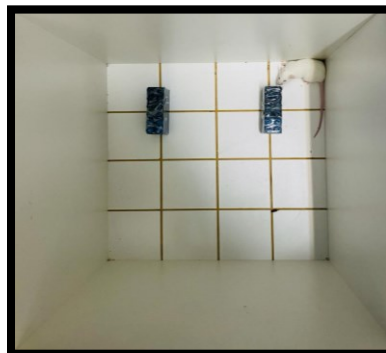
#### 4.7.6 Teste de Reconhecimento de objeto

A tarefa de reconhecimento de objetos é um teste comportamental mnemônico efetivo que utiliza o paradigma de reconhecimento de objetos. A memória de reconhecimento confere a habilidade de discriminar entre uma característica familiar e uma nova, favorecendo a sobrevivência do animal. Os roedores são exploradores por natureza e quando apresentados a objetos familiares e novos, tendem a despender mais tempo explorando o objeto novo em detrimento do familiar. O teste foi realizado conforme descrito por Ennaceur e Delacour (1989), com algumas modificações.

Os animais foram habituados ao aparato durante 10 minutos, 24h antes da realização do teste (habituação curta). No dia da avaliação, os animais foram filmados quando colocados em uma caixa (com dimensões de 40 cm x 50 cm) para a exploração de dois objetos idênticos por 5 minutos, para, em seguida, retornarem à gaiola de origem (treino). Após 60 minutos, os animais foram, novamente colocados em uma caixa e expostos a dois objetos, desta vez diferentes - um idêntico ao anterior e outro novo - por mais 5 minutos (teste).

O comportamento exploratório foi definido a partir de ações como cheirar ou tocar o objeto com o nariz e /ou patas dianteiras. Já o tempo utilizado na exploração de cada objeto foi avaliado e expresso como um percentual do tempo total de exploração. Adicionalmente, foi mensurada a razão de discriminação dos objetos, sendo estabelecida pela razão entre o tempo utilizado em explorar o novo objeto e a soma dos tempos gastos para explorar o novo objeto e o objeto familiar ( $t_{\text{novo}}/t_{\text{novo}} + t_{\text{familiar}} \times 100\%$ ) (Figura 14).

Figura 14 - Teste de reconhecimento de objetos



Fonte: da autora, 2021.

## 4.8 TESTES BIOQUÍMICOS

### 4.8.1 Quantificação da disseminação bacteriana

A quantificação da disseminação bacteriana foi realizada tanto no encéfalo como no sangue nos períodos de 24, 48, 72 horas e 7 dias. Os encéfalos foram coletados e homogeneizados em 200  $\mu$ L de PBS, e o homogenato resultante foi diluído de forma seriada em fator decimal. Em seguida, 10  $\mu$ L de cada diluição foram colocados em placas de ágar de Mueller-Hinton a 37°C. O número de UFC foi contabilizado e os resultados expressos em log de UFC. O sangue foi colocado na placa e o mesmo procedimento foi realizado.

### 4.8.2 Avaliação da função renal

A fim de ratificar e avaliar lesões orgânicas distais ao sítio pulmonar - que são características do processo séptico - a atividade renal foi analisada em função dos níveis de ureia e creatinina na urina, 24h após a pneumosepse, por espectrofotometria.

### 4.8.3. Avaliação do perfil hematológico

Foram realizadas coletas de sangue dos camundongos (0,5 a 1 mL). O sangue foi coletado com auxílio de pipetas de pasteur contendo anticoagulante (EDTA- Sigma). As análises hematológicas foram realizadas com auxílio de um analisador automático de hematologia da marca Mindray. Modelo BC-5300vet, utilizando 13 microlitros de sangue da amostra.

### 4.8.4 Avaliação da permeabilidade vascular e BHE

A avaliação da permeabilidade vascular de tecidos analisados, assim como da BHE foi determinado pela quantidade de Azul de Evans extravasado. Após, os períodos de inoculação da bactéria, os animais foram levemente anestesiados com isoflurano e após, receberam uma injeção de Azul de Evans (40 mg/kg), via plexo retro-orbital. Após 30 minutos, os animais foram anestesiados e perfundidos com solução salina (0,9%). Os tecidos (pulmão, hipocampo, córtex pré-frontal, medula, intestino grosso, fígado, rins, coração) foram removidos, pesados e incubados (em pedaços) em solução aquosa de formamida (1 mL) por 24h h a 55° C. A densidade óptica do sobrenadante foi medida a 610 nm em uma leitora de placas (Multileitora infinite m200

TECAN™ – EUA). As leituras foram interpoladas por regressão linear em uma curva padrão do corante e a formamida foi usada como branco. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tecido (RADU; CHERNOFF, 2013, GOLDIM; DELLA; PETRONILHO, 2019).

#### **4.8.5 Atividade da enzima mieloperoxidase nos tecidos pulmonar e encefálico**

O recrutamento de neutrófilos para o pulmão, hipocampo e córtex pré-frontal foi quantificado indiretamente, por meio da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO). A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em neutrófilos – por isso é utilizada como uma medida indireta da presença dessas células, mas também em monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais. Após a extração, os órgãos foram pulverizados em nitrogênio líquido e o material obtido foi colocado em solução tampão de fosfato de sódio (20 mM; pH 7,4). As amostras, então, foram centrifugadas durante 10 minutos, a 13000 g a 4 °C, e o sobrenadante descartado. O pellet obtido foi ressuspenso em solução de fosfato de sódio (50 mM; pH 6,0), contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; 0,5 %, p/v).

O homogenato resultante foi centrifugado e 30  $\mu\text{L}$  de sobrenadante utilizado para o ensaio enzimático. A reação enzimática foi desenvolvida na presença de tetrametilbenzidina (1,6 mM) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,4 mM (em solução tampão fosfato 80 mM, com pH 5,4). A concentração final de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na placa foi de 0,3 mM (no ensaio do pulmão) e 3 mM (nos ensaios do hipocampo e córtex pré-frontal). A leitura foi realizada imediatamente após a adição da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (pulmão) e após 4 minutos no tecido encefálico. Em ambos os casos, o volume final foi de 230  $\mu\text{L}$ . A absorbância foi medida em um leitor de placas a 600 nm (Ultra microplate reader EL 808, Biot-Tek Instruments™, INC., EUA). A quantidade de proteína total foi estimada pelo ensaio com ácido bicinonínico, (BCA, Thermo Fischer Scientific™, Rockford, IL. EUA) e os valores foram apresentados na forma de unidades de densidade óptica (D.O.)/mg de proteína total.

#### **4.8.6 Análise das citocinas pró-inflamatórias nos tecidos pulmonar e encefálico**

Os níveis de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram quantificados nos tecidos pulmonar e encefálico (córtex pré-frontal e hipocampo), através de kits de ELISA (do inglês, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), de acordo com as recomendações do fabricante (Thermo Fischer Scientific). O pulmão e o tecido cerebral foram separados em microtubos e homogeneizados em um processador de tecidos (Ultra-Turrax T18 IKA básico, IKA®, Alemanha) em uma solução

de PBS contendo: Tween 20 (0,05%), 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 10 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 2 ng/mL de aprotinina e 0,1 mM cloreto de benzetônio.

Os homogenatos foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e centrifugados a 3000×g durante 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi armazenado a -80°C. O conteúdo total de proteínas no sobrenadante foi medido através do método de Bradford.

Os níveis das citocinas foram estimados pela interpolação a partir de uma curva padrão, utilizando medições colorimétricas a 450 nm (com correção de comprimento de onda de 540 nm) em um leitor de placas de ELISA (Multileitora infinite m200 TECAN™ – EUA). Todos os resultados foram expressos como picograma por miligrama (pg/mg) de proteína total.

#### 4.9 IMUNOHISTOQUÍMICA

Após os animais serem anestesiados com quetamina (0,04 mL/Kg) e xilazina (0,1mL/Kg) e eutanasiados, foi realizada a perfusão cardíaca com solução salina 0,9%, seguida de solução de paraformaldeído a 4% (PFA). Em seguida, o encéfalo foi removido da calota craniana e mantidos por 24-48 horas em solução PFA 4% (GIL-MOHAPEL et al., 2013; PAZINI et al., 2016).

Para avaliar a ativação da microglia no hipocampo, os tecidos extraídos foram marcados com o anticorpo para IBA-1 (do inglês, *ionized calcium-binding adaptor protein-1*). Para sua detecção, os cortes histológicos foram submetidos a três lavagens em PBS 0,1M por 5 minutos. Em seguida, para recuperação antigênica, foram realizadas duas lavagens com tampão citrato, uma a temperatura ambiente por 5 minutos e outra a 50°C em banho maria, por 30 minutos. Após mais 3 lavagens em PBS 0,1M, os cortes foram incubados no bloqueio de peroxidase: PBS 0,1M, contendo 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck™, Darmstadt, Alemanha).

Após o bloqueio, 3 lavagens com PBS 0,1M acrescido com 0,3% de Triton-X 100 (Tampão A -TA; Sigma- Aldrich, Steinheim, Alemanha) foram realizadas. Logo em seguida, os cortes foram incubados em solução contendo 2% de soro albumina bovino (BSA; Sigma-Aldrich™, Steinheim, Alemanha) em TA por uma hora, para o bloqueio de reações inespecíficas. Para a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram mantidos, overnight, em uma solução de anticorpo goat anti-IBA-1(Santa Cruz Biotechnology™, California, USA) em TA, sob agitação constante a 4°C. Uma vez finalizado o período de incubação, os cortes foram lavados 3

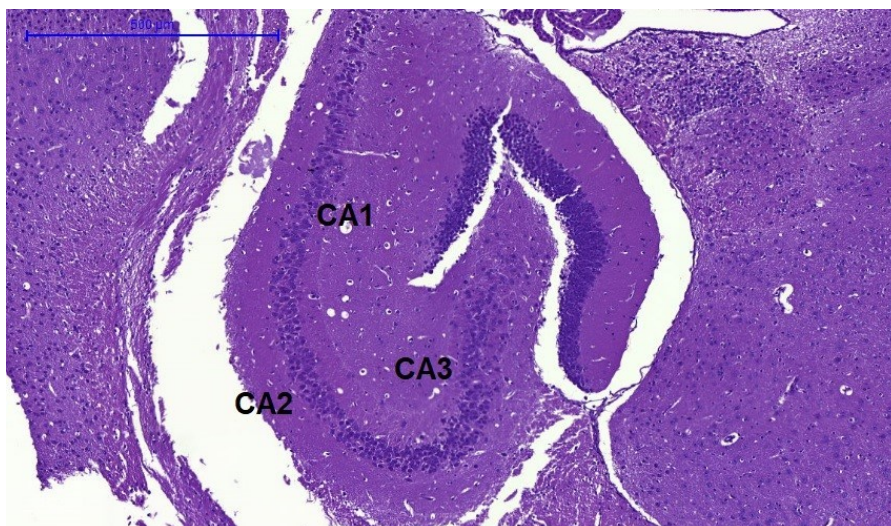


vezes com TA e, então, incubados, por 2 horas, com o anticorpo secundário rabbit anti-goat (1:500, Santa Cruz Biotechnology™, California, EUA), biotinizados, em uma solução TA, sob agitação constante, a temperatura ambiente. Após 3 lavagens em TA, os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina (ABC; Kit, Vector Laboratories™, California, EUA ) em TA, por mais 2 horas sob agitação constante, em temperatura ambiente. Ao finalizar a ligação ao complexo ABC, foram realizadas 3 lavagens com PBS 0,1M e 2 lavagens com tampão acetato de sódio. Para a revelação, foi utilizada uma solução a 0,025% de 3,3,9- hidrocloreto de diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich™, Steinheim, Alemanha) 0,05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, adicionada a uma solução de níquel a 8% em tampão acetato.

Ao fim da revelação, as secções foram lavadas 1 vez em tampão acetato e 2 vezes em PBS 0,1M, sendo então realizada a montagem das lâminas previamente silanizadas. Para as marcações, foi utilizada a desidratação e diafanização com xilol, e as lâminas foram cobertas com Permount® (Fisher Scientific™, New Jersey, EUA) e lamínulas próprias.

As imagens (áreas hipocâmpais) foram adquiridas em uma ampliação de 200 vezes e a área imunopositiva foi expressa como porcentagem de área total analisada (Image J). A análise da porcentagem da área positiva para IBA-1 foi realizada nas áreas CA1, CA2 e CA3, conforme a Figura 15. Além, disso foi realizado análise qualitativa de alguns achados.

Figura 15 – Regiões hipocâmpais analisadas quanto a % de área positiva para IBA-1



Legenda: Fotomicrografia do hipocampo – coloração com hematoxilina e eosina (200 x) e áreas CA1, CA2 e CA3.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados de acordo com sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi utilizado o Teste t de Student para análise dos dados de atividade renal. A análise da sobrevivência dos animais após a inoculação de diferentes concentrações de bactéria (*Klebsiella pneumoniae*) foi realizada por meio do teste de Log-Rank (Mantel-Cox).

Já a comparação do peso corporal e consumo de ração e água durante 30 dias foi analisado por meio da análise de variância (ANOVA) para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey.

Para os dados paramétricos, foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Tukey, e para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn (testes comportamentais, escore clínico, atividade de MPO, permeabilidade da BHE, níveis de citocinas pró-inflamatórias, e atividade microglial).

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, com um nível de significância ajustado para  $p= 0,05$ . Todas as análises e gráficos foram realizados no programa GraphPad Prism 8.0.

A quadro abaixo sumariza os testes estatísticos realizados para cada parâmetro avaliado.

Quadro 3 – Análise estatística

<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>		
Software	PRISMA	
Normalidade	Shapiro-Wilk	
Comparações	Teste t de Student	Função renal
Comparação (sobrevida)	Log Rank de Cox Rantel	Curva de sobrevivência
Comparações múltiplas	ANOVA (amostras repetidas) / Post hoc: Tukey	Peso, escore clínico, consumo de água e ração
	Kruskal-Wallis / Dunn	Curso temporal da disseminação bacteriana (sangue/encéfalo) Teste do Ninho
	ANOVA de duas vias	Testes comportamentais (TCA, LCE, TSC, TBS, TRO) Citocinas (TNF, IL-1B e IL-6) Perfil hematológico MPO BHE Imunohistoquímica (microglia)
Correlações	Pearson	Comportamentos e citocinas
Nível de significância	$p < 0,05$ (5%)	

## 5 RESULTADOS

Os resultados desta pesquisa estão divididos em duas etapas. A primeira etapa diz respeito à caracterização do modelo experimental de pneumosepse (**experimentos I e II**).

Já a segunda etapa (**experimentos III e IV**) foi elaborada para avaliar se este modelo experimental seria capaz de desenvolver comportamentos tipo-depressivo e ansioso e déficits de memória, bem como neuroinflamação aguda e tardia em tecidos encefálicos.

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE PNEUMOSEPSE INDUZIDA POR *Klebsiella pneumoniae*

#### 5.1.1 Avaliação da curva de sobrevivência, disseminação bacteriana, escore clínico e lesão orgânica durante a pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae*

A fim de estabelecer a concentração de bactérias que seria utilizada neste estudo, os animais dos grupos pneumosepse foram inoculados com *Klebsiella pneumoniae* ( $3,6 \times 10^9$  UFC/ml e  $5,9 \times 10^9$  UFC/mL, respectivamente) e os animais do grupo controle foram inoculados com salina (falso-inoculado). As concentrações de  $3,6 \times 10^9$  e de  $5,9 \times 10^9$  UFC/animal resultaram em taxas de mortalidade em torno de 20% e 60%, respectivamente, quando avaliadas em 10 dias (Figura 16A). A concentração de  $5,9 \times 10^9$  UFC/animal foi selecionada para os experimentos subsequentes.

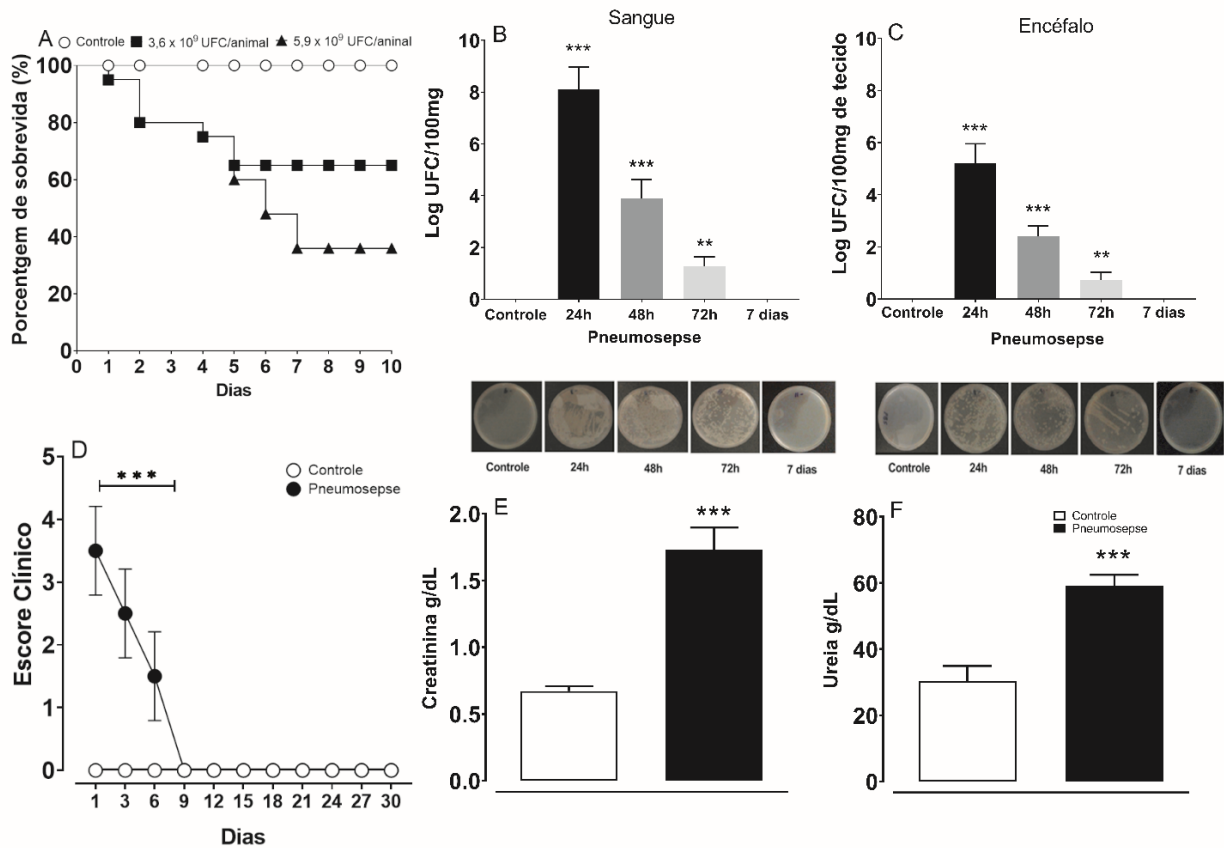
Foi selecionada a maior concentração bacteriana, a fim de mimetizar o modelo de sepse e representar a realidade clínica na qual a incidência de mortalidade varia entre (40%-65%) (FINFER et al., 2013; FLEISCHMANN et al., 2016, RUDD et al, 2020). Adicionalmente, a gravidade da síndrome e processo inflamatório sistêmico correlacionam-se com o número de UFC inoculados (SORDI et al, 2013; GONÇALVES et al, 2017).

Ainda nesta etapa, a evolução temporal da disseminação bacteriana no sangue e no tecido encefálico foi avaliada por meio da contagem de UFC. Os resultados apresentados demonstram que ocorreu um aumento significativo do número de UFC, indicando disseminação bacteriana, no sangue [ $F_{(4,26)} = 45,5$ ;  $p > 0,001$ ] (Figura 16B) e no encéfalo [ $F_{(4,26)} = 37,1$ ;  $p > 0,001$ ] (Figura 16C), nos períodos de 24h ( $p < 0,001$ ), 48h ( $p < 0,001$ ) e 72h ( $p < 0,05$ ). Em 7 dias, entretanto, não foi observado disseminação bacteriana, tanto no sangue [ $F_{(4, 26)} = 1,765$ ;  $p = 0,187$ ] como no encéfalo [ $F_{(4, 26)} = 0,234$ ;  $p = 0,294$ ].

Além disso, o escore clínico dos animais foi avaliado durante 30 dias, mostrando valores elevados até o 6º dia no grupo séptico ( $p < 0,001$ ) e estabilizando-se após este período (Figura 16D).

A avaliação da função renal foi realizada a fim de averiguar a extensão da pneumosepse, sugerindo, desta forma, lesão orgânica distal. Para tanto, avaliamos os níveis de ureia e creatinina na urina, que se demonstraram aumentados 24 horas após a indução da pneumosepse, quando comparada ao grupo controle (falso-inoculado) [ $t_{(6)} = 5,615$ ;  $p < 0,001$ ] e [ $t_{(6)} = 5,044$ ;  $p < 0,001$ ], respectivamente (Figura 16E e Figura 16F).

Figura 16 - Curva de sobrevivida, disseminação bacteriana, escore clínico e lesão orgânica durante a pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae*



Legenda: (A): **Curva de sobrevivida:** os camundongos foram inoculados via intratraqueal com  $5,9 \times 10^9$  e  $3,6 \times 10^9$  UFC/ animal, os camundongos controle (falso-inoculados) receberam salina (n=10 animais/grupo). Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivida. A análise estatística foi realizada pelo teste log-rank (Mantel-Cox), \* $p < 0,01$ . A concentração de  $5,9 \times 10^9$  UFC/animal foi escolhida para os experimentos subsequentes. (B, C): **Curso temporal da disseminação bacteriana no sangue e no encéfalo:** Sangue e encéfalo foram coletados, homogeneizados (encéfalo) e diluídos para crescimento em placas de ágar Mueller-Hinton. Os dados estão expressos como log de UFC, com n=6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós teste de Dunn. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $< 0,01$ ; (D) **Escore clínico:** Os animais dos grupos controle e pneumosepse (n=10/grupo) foram pontuados com um escore que varia de 0 a 6 (melhor e pior condição clínica, respectivamente) durante um curso temporal de 30 dias. Foi realizada análise não-paramétrica Kruskal-Wallis seguido Dunn (\*\*\*) $p < 0,001$ ; (E e F): **Marcadores de disfunção renal:** creatinina (E) e uréia (F), mensuradas 24 horas após a pneumosepse, n = 10 animais/grupo. Os resultados foram analisados por meio de teste t de *student*.  $p < 0,001$ . Os valores estão expressos em média±EPM.

### 5.1.2 Efeitos da pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* sobre o perfil hematológico

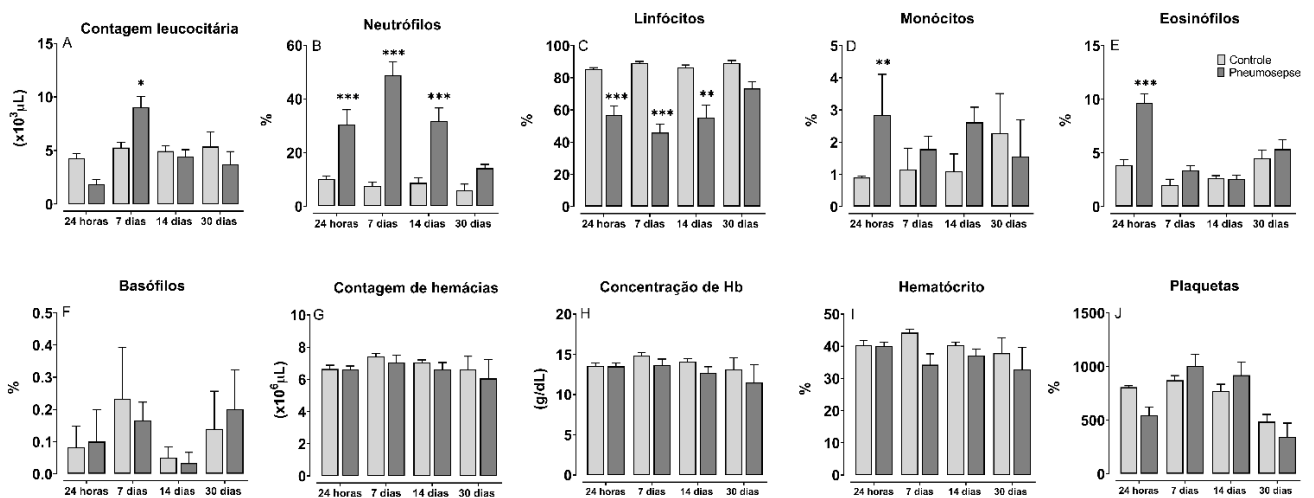
A instilação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae* nos camundongos na concentração de  $5,9 \times 10^9$  UFC/mL resultou em um efeito significativo na contagem leucocitária [ $F_{(3,32)} = 6,6$ ;

$p < 0,01$ ], sendo demonstrado leucocitose no 7º dia após a pneumosepse ( $p < 0,01$ ), que pode ser observada na Figura 17A.

Além disso, observou-se, neutrofilia [ $F_{(3,32)} = 36,5$ ;  $p < 0,001$ ] em 24, 7 dias e 14 dias após a pneumosepse ( $p < 0,001$ ) (Figura 17B), assim como linfocitopenia [ $F_{(3,32)} = 90,41$ ;  $p < 0,0001$ ], em 24h ( $p < 0,001$ ), 7 dias ( $p < 0,001$ ) e 14 dias ( $p < 0,01$ ) (Figura 17C). Adicionalmente, foi observado aumento no número de monócitos [ $F_{(3,32)} = 9,85$ ;  $p < 0,05$ ] e eosinófilos [ $F_{(3,32)} = 23,62$ ;  $p < 0,001$ ] em 24 h.

Não houve alteração em relação ao número de basófilos [ $F_{(3,32)} = 0,159$ ;  $p = 0,923$ ], contagem de hemácias [ $F_{(3,32)} = 0,101$ ;  $p = 0,958$ ], concentração de hemoglobina [ $F_{(3,32)} = 0,335$ ;  $p = 0,801$ ], hematócrito [ $F_{(3,32)} = 0,936$ ;  $p = 0,432$ ] e plaquetas [ $F_{(3,32)} = 0,223$ ;  $p = 0,6402$ ] (Figura 17F, 17G, 17H, 17I, 17J, respectivamente).

Figura 17 – Perfil hematológico de animais submetidos à pneumosepse por *Klebsiella pneumoniae*



Legenda: Perfil hematológico temporal após a indução de pneumosepse (n= 6 animais/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste pós teste de Tukey e foi considerado significativo \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Os valores estão expressos em média±EPM.

### 5.1.3 Efeitos da pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* sobre o consumo alimentar (ração e água), peso e bem-estar animal

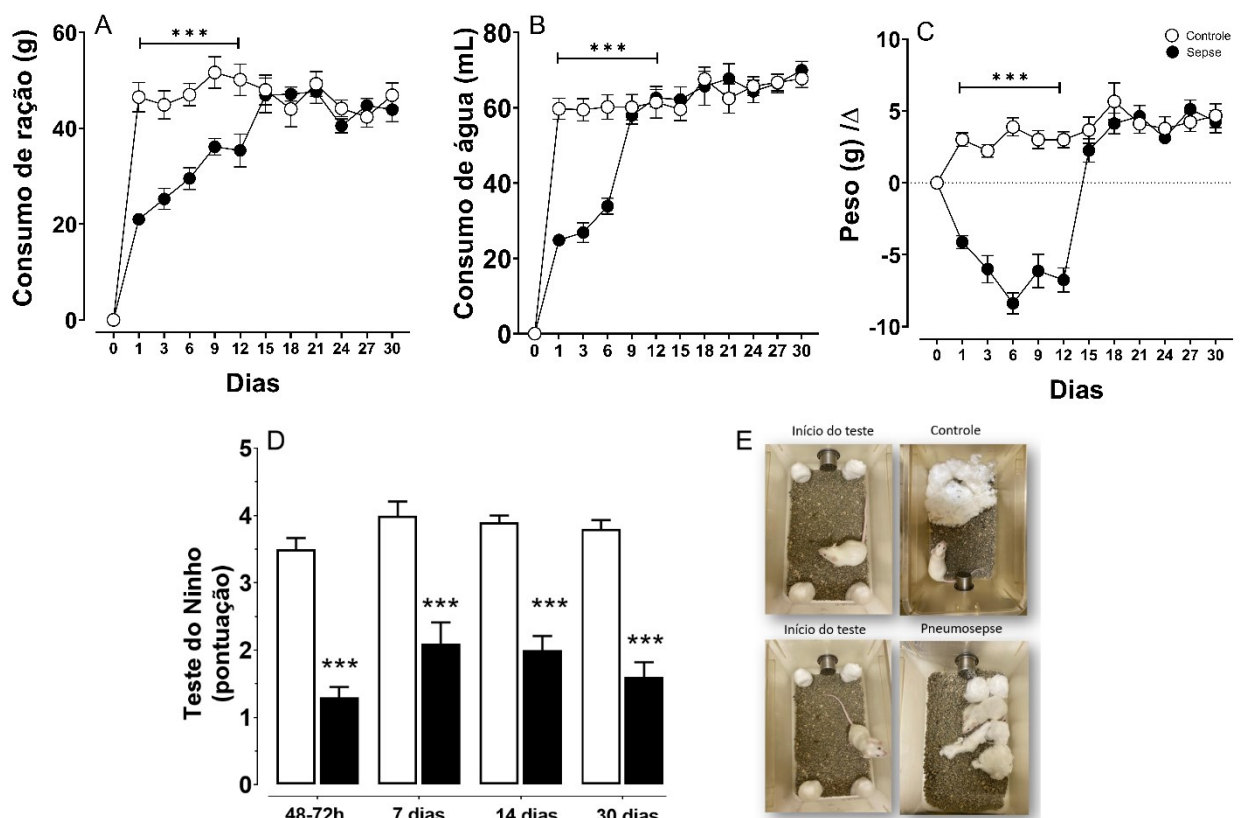
Conforme apresentado na Figura 18A, foi observado uma diminuição significativa no consumo de ração no grupo pneumosepse até o 12º dia após a indução da infecção [ $F_{(1,18)} = 37,1$   $p > 0,001$ ]. Após este período, os animais do grupo pneumosepse e do grupo controle

apresentaram um padrão de consumo semelhante. Na avaliação do consumo de água (Figura 18B), foi observada uma diferença entre os dois grupos até o 9º dia após a indução da pneumosepse [ $F_{(1,18)} = 39,24$   $p > 0,001$ ], desaparecendo após este período.

Na avaliação do peso corporal, os animais sépticos apresentaram uma perda de peso significativa até o 12º dia após a indução da pneumosepse [ $F_{(1,18)} = 33,04$ ,  $p > 0,001$ ], de acordo com a representação na Figura 18C. A partir do 13º dia, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Com relação ao bem-estar animal avaliado por meio do teste do ninho, os animais sépticos apresentaram uma pontuação significativamente menor em relação ao grupo controle em todos os tempos avaliados ( $p < 0,001$ ) (Figura 18D). A Figura 18E demonstra um registro representativo do ninho formado por cada grupo experimental, no 14º dia.

Figura 18 - Consumo (ração, água), peso e bem-estar durante a pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae*



Legenda: (A e B) **Consumo de ração e água:** Os grupos controle e pneumosepse foram avaliados em um curso temporal de 30 dias. Foi realizado ANOVA para medidas repetidas e pós teste de Tukey (\*\*\*)  $p < 0,001$ ), ( $n = 10$



animais / grupo) (C) **Avaliação do peso corporal:** Os grupos controle e pneumosepse foram avaliados em um curso temporal de 30 dias. Foi realizado ANOVA para medidas repetidas e pós teste de Tukey (\*\*\*)  $p < 0,001$ , ( $n = 10$  animais/grupo). (D) **Teste do ninho :** pontuações referentes aos parâmetros para formação do ninho ( $n = 10$  animais / grupo, (E): representação de um resultado do teste do ninho em 14 dias, comparando animal controle e pneumosepse). A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM.

## 5.2 EFEITO DA PNEUMOSEPSE INDUZIDA POR *Klebsiella pneumoniae* NOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS AVALIADOS TEMPORALMENTE

Nesta seção deste estudo, nos períodos de 48-72h, 7, 14 e 30 dias após a indução da pneumosepse foram realizados os seguintes testes comportamentais: campo aberto, labirinto em cruz elevada, suspensão pela cauda, borrifagem de sacarose e reconhecimento de objetos.

### 5.2.1 Efeito da pneumosepse nos parâmetros de exploração e emocionalidade nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado

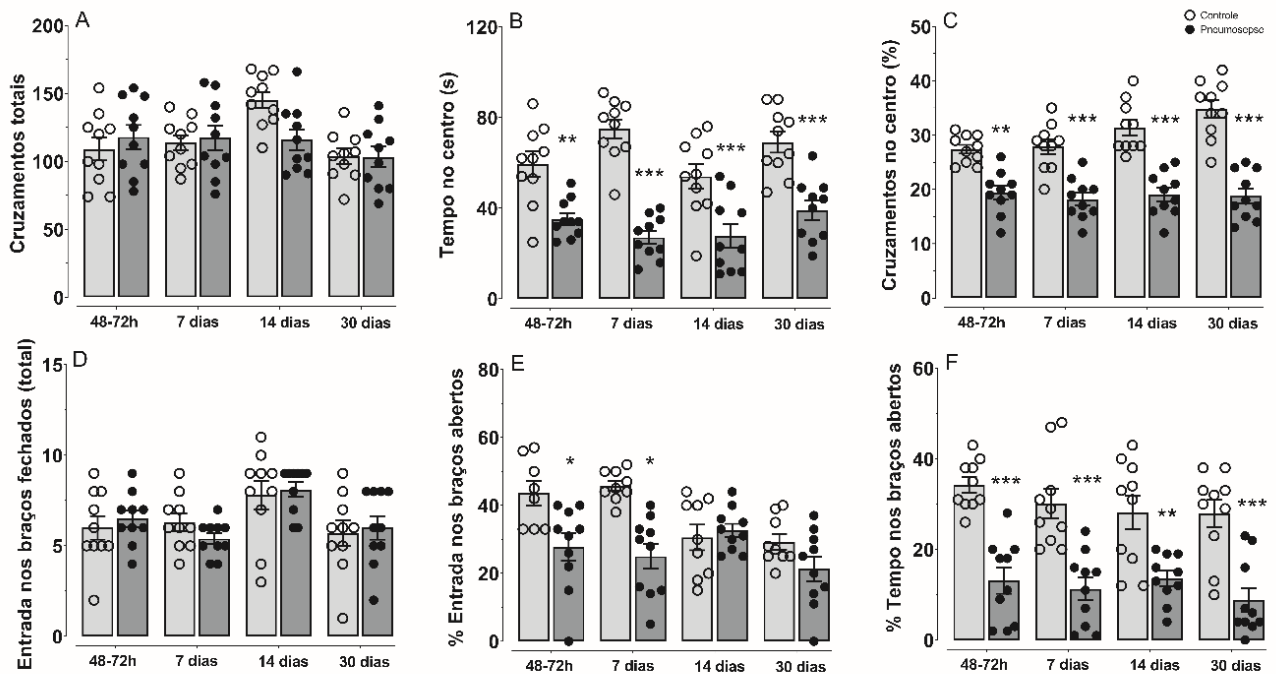
A ANOVA de duas vias não revelou efeitos significativos no número total de cruzamentos [ $F_{(3,72)} = 2,59$ ,  $p = 0,06$ ], avaliada no teste de campo aberto (Figura 19A). Em contrapartida, houve um efeito significativo do fator pneumosepse em relação ao tempo no centro do aparato [ $F_{(3,72)} = 73,24$ ,  $p < 0,001$ ] (Figura 19B). As comparações *post hoc* indicaram uma diminuição significativa no tempo gasto no centro do aparato em 48-72h ( $p < 0,05$ ), 7 dias ( $p < 0,001$ ), 14 dias ( $p < 0,001$ ) e 30 dias ( $p < 0,001$ ) nos grupos pneumosepse. Adicionalmente, foi demonstrado um efeito significativo da pneumosepse em relação à porcentagem de cruzamentos no centro [ $F_{(3,72)} = 11,12$ ,  $p < 0,05$ ] (Figura 19C). Houve uma diminuição significativa na porcentagem de cruzamentos centrais no grupo pneumosepse nos períodos de 48-72h ( $p < 0,05$ ), 7 dias ( $p < 0,001$ ), 14 dias ( $p < 0,001$ ) e 30 dias ( $p < 0,001$ ).

Em relação aos parâmetros avaliados no teste de labirinto em cruz elevado, a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos no número total de entradas nos braços fechados [ $F_{(3,72)} = 0,65$ ,  $p = 0,61$ ] (Figura 19D). Não obstante, foi observado um efeito significativo para a interação entre os fatores pneumosepse e tempo, em relação à porcentagem de entrada nos braços abertos [ $F_{(3,72)} = 2,805$ ,  $p < 0,04$ ] (Figura 19E). A análise *post hoc* revelou uma diminuição significativa da porcentagem de entrada nos braços abertos nos grupos pneumosepse nos períodos de 48-72h ( $p = 0,01$ ) e 7 dias ( $p = 0,02$ ). Não houve diferença entre os grupos nos períodos de 14 e 30 dias após a indução da pneumosepse ( $p = 0,97$  e  $p = 0,86$ , respectivamente).

Em relação ao percentual relativo ao tempo despendido nos braços abertos, foi demonstrada, novamente, a interação entre os fatores pneumosepse e tempo [ $F_{(3,72)}=95,52$ ,  $p<0,001$ ]. As comparações *post hoc* revelaram uma diminuição da porcentagem de tempo nos braços abertos do aparato nos grupos pneumosepse em 48h ( $p<0,01$ ), 7, 14 e 30 dias ( $p<0,001$ ) (Figura 19F).

Desta forma, os dados sugerem que o modelo de pneumosepse foi capaz de desenvolver alterações comportamentais do tipo-ansioso nos animais.

Figura 19 - Parâmetros comportamentais no teste de campo aberto e labirinto em cruz elevada



Legenda: Avaliação de parâmetros comportamentais no teste de campo aberto: (A) Número total de cruzamentos, (B) Tempo no centro do aparato (segundos), (C) Porcentagem de cruzamentos no centro tempo; no teste de labirinto em cruz elevado: (D) Número de entrada nos braços fechados, (E) Porcentagem de entrada nos braços abertos, (F) Porcentagem de tempo que os animais permaneceram nos braços abertos. Cada animal está representado por símbolo individual (n=10 animais/grupo). Foi realizada a ANOVA de duas vias e pós teste de Tukey. (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  e \*\*\*  $p<0,001$ ). Os valores estão expressos em média±EPM.

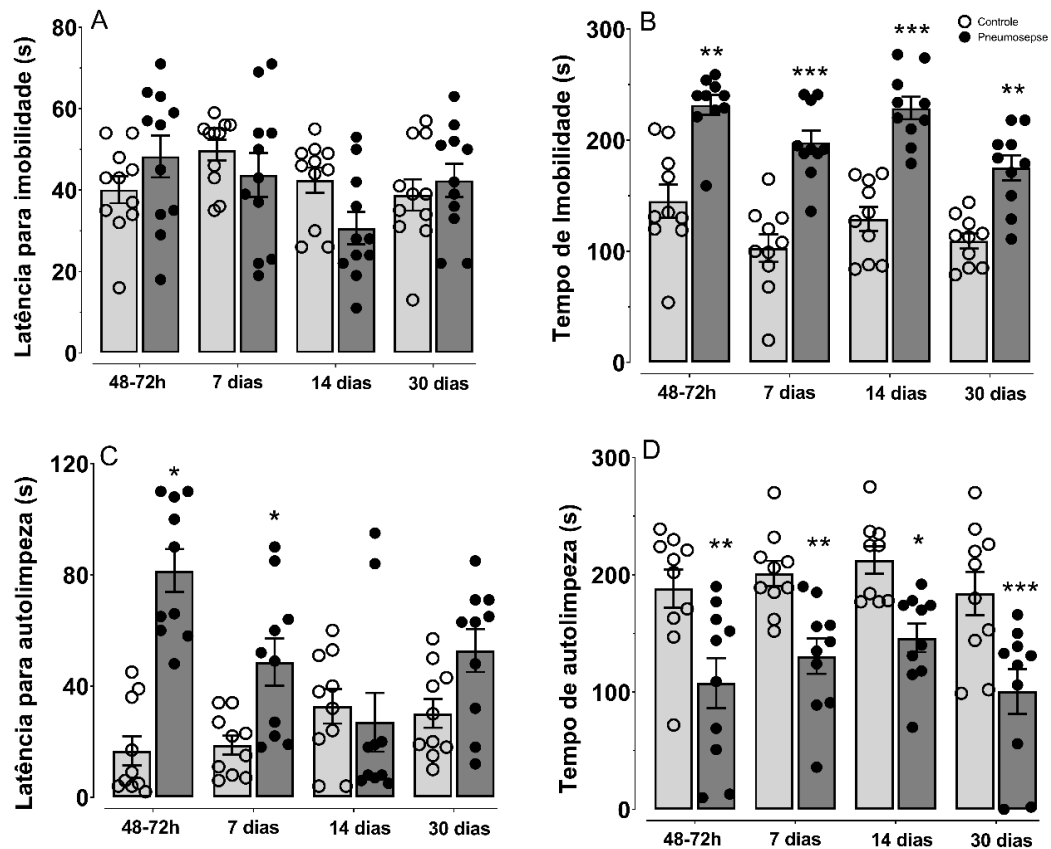
### 5.2.2 Efeito da pneumosepse nos parâmetros de emocionalidade nos testes de suspensão pela cauda e de borrifagem de sacarose

Por meio da avaliação dos parâmetros do TSC, a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos na latência para a imobilidade [ $F_{(3,72)} = 2,53$ ,  $p=0,07$ ] (Figura 20A).

Por outro lado, conforme demonstrado na Figura 20B, observou-se um efeito de interação significativo entre pneumosepse e tempo de imobilidade nos períodos avaliados [ $F_{(3,72)}=8,13$ ,  $p < 0,001$ ]. A análise *post hoc* revelou um aumento significativo no tempo de imobilidade nos grupos pneumosepse em 48h ( $p < 0,01$ ), 7 dias ( $p < 0,001$ ), 14 dias ( $p < 0,001$ ) e 30 dias ( $p < 0,01$ ).

Os dados representados nas Figura 20C e 20D relacionam-se ao teste de borrifagem de sacarose. A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para a interação entre os fatores pneumosepse e latência para autolimpeza [ $F_{(3,72)}= 8,34$ ,  $p < 0,001$ ], bem como pneumosepse e tempo despendido em autolimpeza [ $F_{(3, 72)} = 43,08$ ,  $p < 0,001$ ]. No primeiro caso, a análise *post hoc* indicou uma diminuição da latência para autolimpeza nos grupos pneumosepse nos períodos de 48-72h ( $p < 0,001$ ) e 7 dias ( $p < 0,05$ ) (Figura 20C). Não houve diferença em relação aos períodos de 14 dias ( $p=0,94$ ) e 30 dias ( $p=0,26$ ). Interessantemente, os animais submetidos ao modelo de pneumosepse apresentaram um menor tempo de autolimpeza nos períodos de 48h-72h ( $p < 0,01$ ), 7 dias ( $p < 0,05$ ), 14 dias ( $p < 0,05$ ) e 30 dias ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos controle (Figura 20D). Portanto, estes resultados sugerem que o modelo de sepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* induziu um comportamento tipo-depressivo nos animais, perdurando a longo prazo.

Figura 20 – Parâmetros comportamentais nos testes de suspensão pela cauda e borrifagem de sacarose



Legenda: Avaliação de parâmetros comportamentais no teste de suspensão pela cauda: (A) latência para a imobilidade, (B) tempo de imobilidade e no teste de borrifagem de sacarose: (C) latência para autolimpeza e (D) tempo de autolimpeza. Cada animal está representado por símbolo individual (n=10-12 / grupo). A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de duas vias e pós teste de Tukey. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001. Os valores estão expressos em média±EPM.

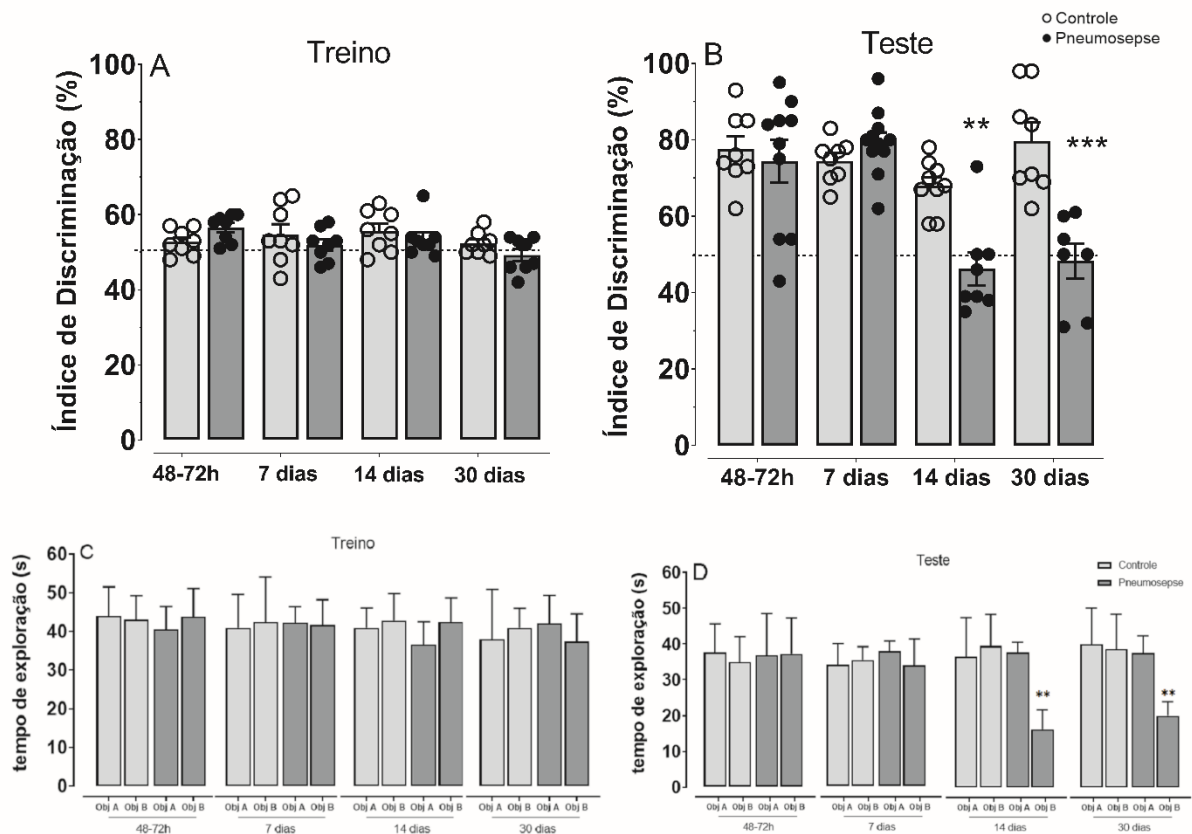
### 5.2.3 Efeito da pneumosepsis nos parâmetros de memória no teste de reconhecimento de objetos

A Figura 21A demonstra o período de treino do teste, enquanto a Figura 21B diz respeito aos resultados obtidos após a exposição de novo objeto, referente ao índice de discriminação. Neste estudo, não houve preferência pelos objetos em nenhum dos grupos experimentais nos períodos de 48-72 horas (p=0,773) e 7 dias (p=0,9445). Por outro lado, os dados mostram que o objeto novo foi explorado pelos animais sépticos por menor tempo nos períodos de 14 e 30 dias [ $F_{(3,72)} = 8,658$ ,  $p < 0,001$ ], ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente), indicado pela diminuição

significativa no índice de discriminação, sugerindo o não aprendizado da tarefa na fase tardia da doença.

Ratificando esses resultados, observa-se que não houve diferença entre o tempo de exploração em segundos de ambos os objetos no treino (Figura 21C), confirmando que não houve preferência inata por nenhum dos objetos utilizados [ $F_{(3,72)}=0,965$ ,  $p=0,856$ ]. No teste (Figura 21D), observa-se que o grupo pneumosepse obteve um menor tempo de exploração do novo objeto (objeto B) comparado ao objeto familiar (objeto A) [ $F_{(3,72)}=6,548$ ,  $p<0,001$ ], nos períodos de 14 e 30 dias ( $p<0,01$ ).

Figura 21 – Parâmetros comportamentais no teste de reconhecimento de objetos



Legenda: Índice de discriminação de objetos (A) Treino e (B) Teste; Tempo de exploração (s) (C) Treino e (D) Teste, realizado por meio do teste de reconhecimento de objetos (curto prazo). Cada animal é representado por símbolo individual (n=8-10 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de duas vias e pós teste de Tukey. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ . Os valores estão expressos em média±EPM.

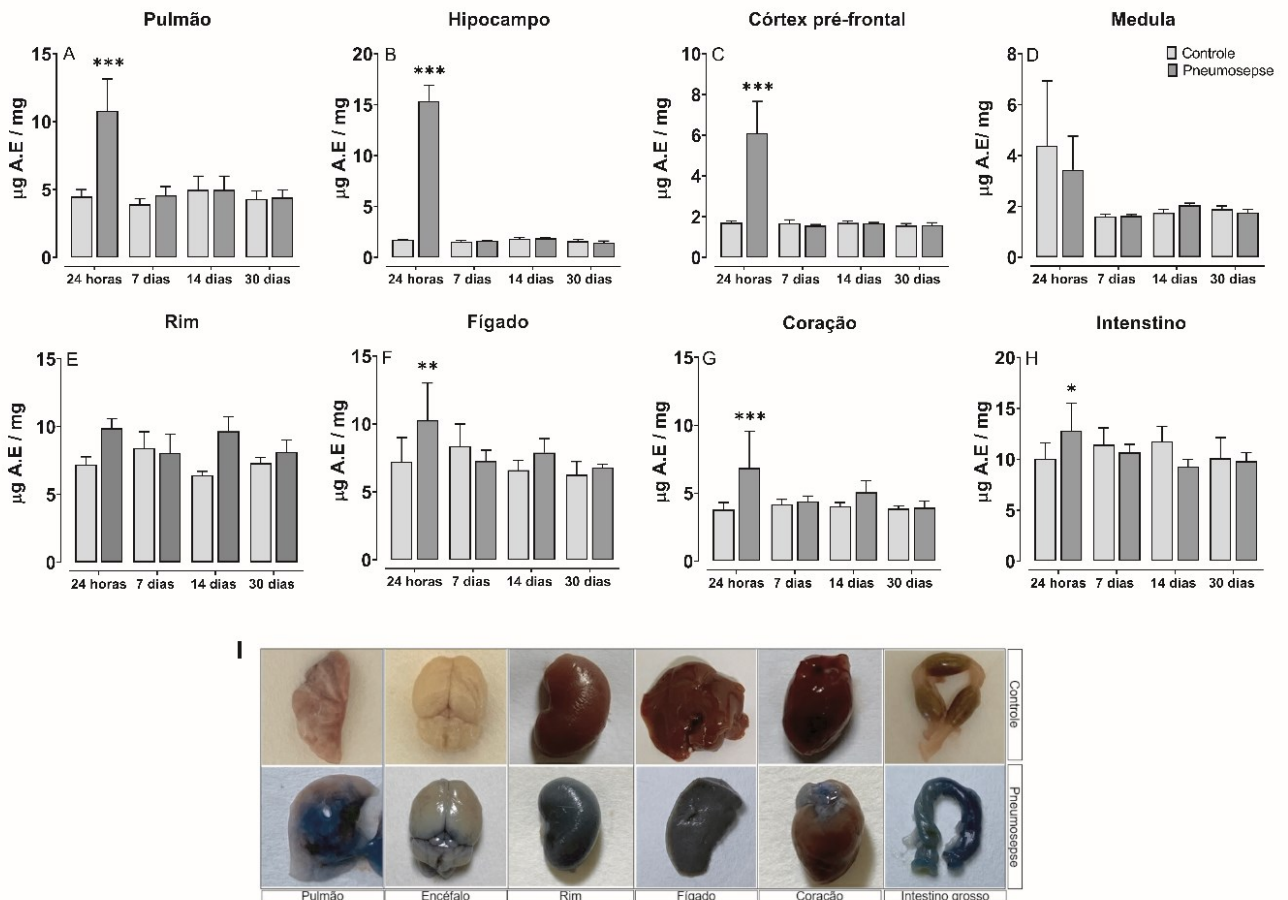
### 5.3 EFEITO DA PNEUMOSEPSE INDUZIDA POR *Klebsiella pneumoniae* NO PERFIL NEUROINFLAMATÓRIO AVALIADOS TEMPORALMENTE

#### 5.3.1 Efeito da pneumosepse na permeabilidade vascular tecidual e na BHE

Nos animais submetidos à pneumosepse, observou-se aumento da permeabilidade vascular tecidual, com aumento significativo do extravasamento de Azul de Evans no período de 24h, em tecidos como pulmão [ $F_{(3,34)} = 6,57$ ,  $p < 0,001$ ), fígado [ $F_{(3,34)} = 5,02$ ,  $p < 0,05$ ), coração [ $F_{(3,34)} = 6,17$ ,  $p < 0,001$ ] e intestino grosso [ $F_{(3,34)} = 7,01$ ,  $p < 0,05$ ] (Figura 22A, 22F, 22G, 22H, respectivamente).

Adicionalmente, foi demonstrado aumento da permeabilidade da BHE, por meio de extravasamento de Azul de Evans em 24h, em regiões como o hipocampo [ $F_{(3,34)} = 61,80$ ;  $p < 0,001$ ], e córtex pré-frontal [ $F_{(3,34)} = 16,26$ ,  $p < 0,001$ ] (Figura 22B e 22C, respectivamente).

Figura 22 – Permeabilidade vascular tecidual e BHE em camundongos submetidos a pneumosepse por *Klebsiella pneumoniae*



Legenda: Avaliação do extravazamento tecidual, por meio do Azul de Evans após a indução de pneumosepse (n= 6 animais/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste pós teste de Tukey e foi considerado significativo \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001). Os valores estão expressos em média±EPM. A Figura I demonstra fotos representativas de tecidos do grupo controle e pneumosepse no tempo de 24h após a indução de pneumosepse.

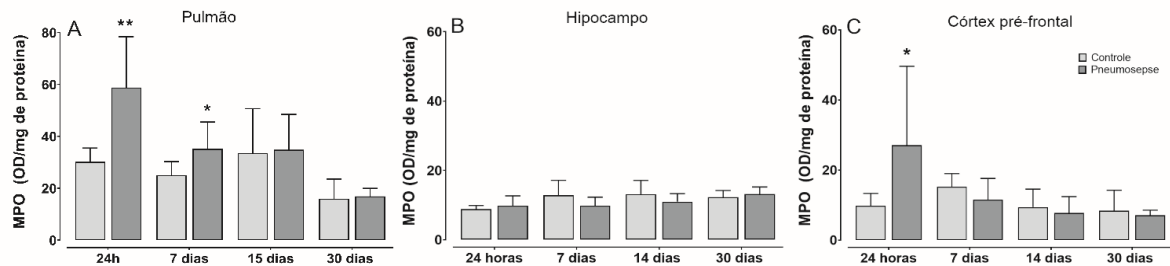
### 5.3.2 Efeitos da pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* sobre a atividade da MPO no pulmão, hipocampo e córtex pré-frontal

Foi demonstrado um efeito significativo da pneumosepse em relação à atividade da MPO no pulmão [ $F_{(3, 40)}=10,87$ ,  $p < 0,001$ ] (Figura 23A). Comparações *post hoc* demonstraram aumento da atividade enzimática nos pulmões em 24h ( $p>0,01$ ) e 7 dias ( $p>0,05$ ) nos grupos pneumosepse.

Não foi evidenciado aumento de atividade da MPO no hipocampo [ $F_{(3, 40)}=1,727$ ,  $p=0,174$ ] (Figura 23B). Não obstante, foi observada uma maior atividade da enzima no córtex pré-

frontal de forma aguda, 24h após a indução da doença [ $F_{(3, 40)} = 3,55$ ,  $p < 0,05$ ], conforme demonstrado na Figura 23C. A quantificação deste parâmetro demonstra que a pneumosepse, aumentou a infiltração de neutrófilos no órgão acometido (pulmão), que durou pelo menos 7 dias após a indução da sepse, e adicionalmente foi capaz de induzir o recrutamento agudo de neutrófilos para o córtex pré-frontal.

Figura 23 – Atividade de MPO após a indução de pneumosepse com *Klebsiella pneumoniae*



Legenda: Atividade da MPO no pulmão (A), hipocampo (B) e córtex pré-frontal (C) após a indução de pneumosepse ( $n = 6$  animais / grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias e teste pós teste de Tukey e foi considerado significativo \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM.

### 5.3.3 Efeitos da pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no pulmão, hipocampo e córtex pré-frontal

A ANOVA de duas vias indicou um aumento significativo nos níveis de TNF- $\alpha$  nos pulmões [ $F_{(3,56)} = 63,67$ ;  $p < 0,001$ ], no hipocampo [ $F_{(3,56)} = 72,54$ ;  $p < 0,001$ ] e no córtex pré-frontal [ $F_{(3,56)} = 45,59$ ;  $p < 0,001$ ], representados pelas Figura 24A, 24B e 24C.

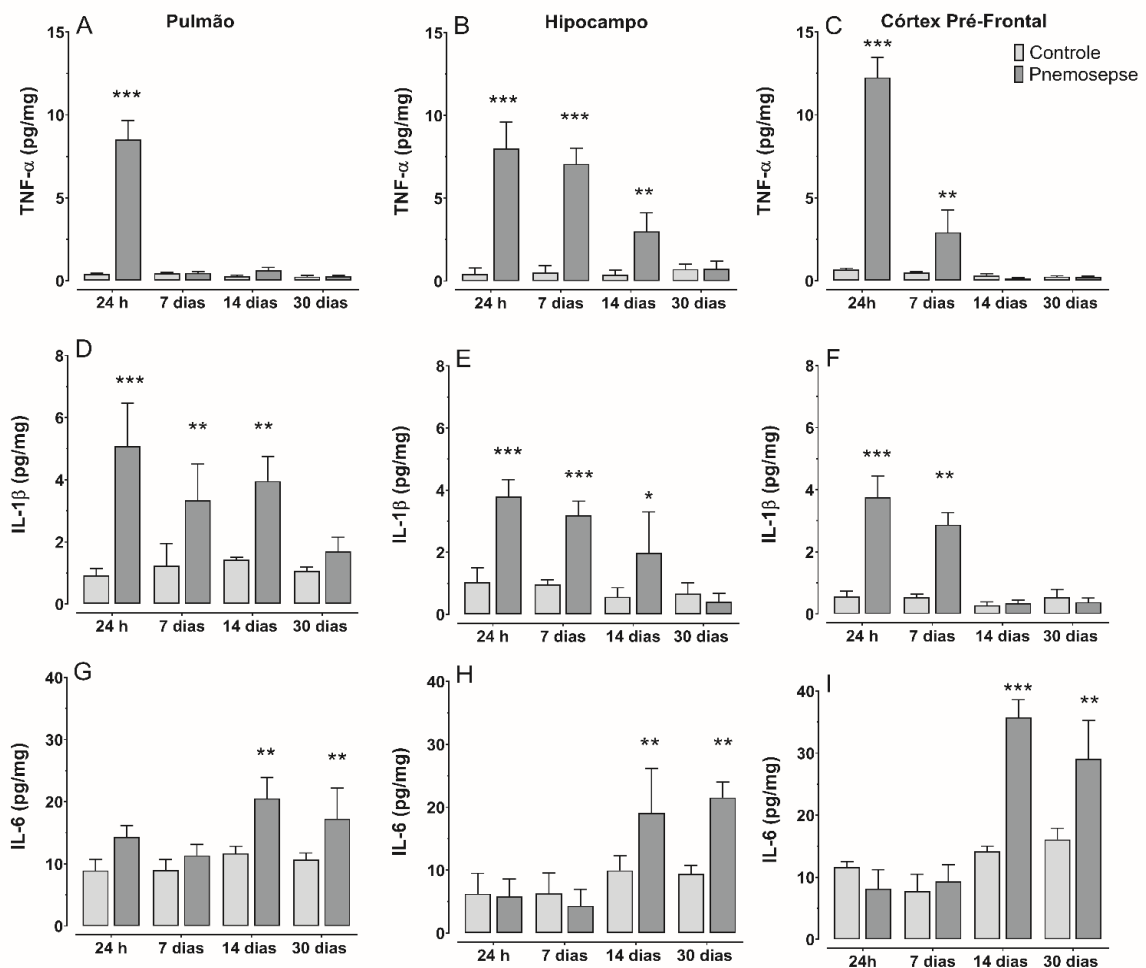
Complementarmente, as análises *post hoc* evidenciaram um aumento desta citocina nos pulmões apenas no período de 24h após a pneumosepse (Figura 24A). Já no hipocampo, os níveis de TNF- $\alpha$  mantiveram-se elevados até 14 dias após a indução da infecção, conforme demonstrado na Figura 24B. Já no córtex pré-frontal, os níveis de TNF- $\alpha$  permaneceram elevados até 7 dias pós o insulto séptico (Figura 24C).

Os níveis de de IL-1 $\beta$ , de forma similar ao TNF- $\alpha$ , estavam significativamente aumentadas no pulmão [ $F_{(3,56)} = 33,02$ ;  $p < 0,001$ ], no córtex pré-frontal [ $F_{(3,56)} = 46,13$ ;  $p < 0,001$ ] e no hipocampo [ $F_{(3,56)} = 30,61$ ;  $p < 0,001$ ], permanecendo elevados no pulmão e no hipocampo por até 14 dias, conforme demonstrado nas Figuras 24D e 24E. Já na região do córtex pré-frontal, houve um aumento significativo dos níveis de IL-1 $\beta$  até 7 dias após a indução da pneumosepse (Figura 24F).



A ANOVA de duas vias também demonstrou que houve diferença significativa na concentração de IL-6 nos pulmões [ $F_{(3,56)} = 6,97$ ;  $p < 0,01$ ] no hipocampo [ $F_{(3,56)} = 7,53$ ;  $p < 0,01$ ] e no córtex pré-frontal [ $F_{(3,56)} = 6,76$ ;  $p < 0,001$ ], elevando-se de forma mais tardia (14 e 30 dias) (Figura 24G, 24H e 24I, respectivamente). Desta feita, a avaliação temporal dos níveis das citocinas analisadas delineou a trajetória inflamatória neste modelo experimental de pneumosepse, abarcando, de forma contundente, áreas encefálicas tanto nas fases aguda como tardia.

Figura 24 – Perfil de citocinas pró-inflamatórias após a indução de pneumosepse com *Klebsiella pneumoniae*



Legenda: Perfil temporal de citocinas pró-inflamatórias nos pulmões, hipocampo e córtex pré-frontal após a indução de pneumosepse (n= 8 animais/grupo). A, B, C: concentração de TNF-  $\alpha$ ; D, E, F: concentração de IL-1 $\beta$ ; G, H, I: concentração de IL-6. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste pós teste de Tukey e foi considerado significativo \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM.

### **5.3.4 Correlação entre os níveis das citocinas pró-inflamatórias no hipocampo e córtex pré-frontal e parâmetros comportamentais na pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae***

O Quadro 4 demonstra correlações entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) e parâmetros comportamentais.

Em relação ao TCA, observou-se uma forte correlação negativa entre a % de tempo no centro do aparato e níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$  no hipocampo nos períodos de 48h, 7 e 14 dias. No córtex pré-frontal essas correlações foram demonstradas em 14 e 30 dias. Em relação aos níveis de IL-6 no hipocampo e córtex pré-frontal, foram observadas moderadas correlações negativas em 14 e 30 dias.

No teste de LCE, observou-se moderadas correlações negativas entre % de tempo nos braços abertos e níveis de TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  no hipocampo em 48h, 14 e 30 dias e de IL-6 em 14 e 30 dias.

Adicionalmente, no TBS, observou-se moderadas correlações negativas entre tempo de autolimpeza e níveis de TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  no hipocampo, e níveis de IL-6 em 14 e 30 dias.

Quadro 4 – Correlações entre parâmetros comportamentais e citocinas no hipocampo e córtex pré-frontal

Testes Comportamentais		Hipocampo			Córtex pré-frontal		
		TNF	IL1- $\beta$	IL-6	TNF	IL-1 $\beta$	IL-6
CA: % tempo centro	48h	- 0,84 ***	- 0,81***	- 0,15	- 0,80**	- 0,74*	- 0,10
	7 dias	- 0,79**	- 0,82***	- 0,12	- 0,79*	- 0,86***	- 0,08
	14 dias	- 0,77 **	- 0,73**	- 0,70**	- 0,17	- 0,11	- 0,65*
	30 dias	- 0,19	- 0,21	- 0,62*	- 0,26	- 0,12	- 0,73*
LCE: % TBA	48h	- 0,21	- 0,24	- 0,13	- 0,12	- 0,16	- 0,11
	7 dias	- 0,65**	- 0,70**	- 0,14	- 0,08	- 0,25	- 0,21
	14 dias	- 0,62**	- 0,68**	- 0,24	- 0,17	- 0,11	- 0,14
	30 dias	- 0,63	- 0,19	- 0,32	- 0,21	- 0,07	- 0,11
TSC: imobilidade	48h	0,70**	0,78**	0,17	0,05	0,09	0,21
	7 dias	0,69**	0,71**	0,12	0,07	0,06	0,23
	14 dias	0,70**	0,78**	0,70*	0,14	0,19	0,30
	30 dias	0,13	0,10	0,62*	0,06	0,08	0,24
TBS: autolimpeza	48h	-0,70**	- 0,65**	- 0,17	- 0,02	- 0,21	- 0,27
	7 dias	- 0,65*	- 0,60*	- 0,23	- 0,12	- 0,29	- 0,75
	14 dias	- 0,60*	- 0,71*	- 0,60*	- 0,16	- 0,31	- 0,63
	30 dias	- 0,15	- 0,24	- 0,63*	- 0,24	- 0,34	- 0,47

Legenda: CA: campo aberto, LCE: labirinto em cruz elevado, % TBA: porcentagem de tempo nos braços abertos, TSC: teste de suspensão pela cauda, TBS: teste de borrifagem de sacarose. Correlações entre parâmetros comportamentais e níveis de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo e córtex pré-frontal. dados foram analisados por meio da correlação de Pearson. A correlação foi considerada significativa para \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$ .

### 5.3.5 Efeitos da pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* sobre a ativação microglial

A fim de reforçar os mecanismos de neuroinflamação, foi avaliada a ativação microglial em áreas hipocâmpais (CA1, CA2 e CA3) através do estudo imunohistoquímico (marcação de células positivas para IBA-1), conforme demonstrado na Figura 25.

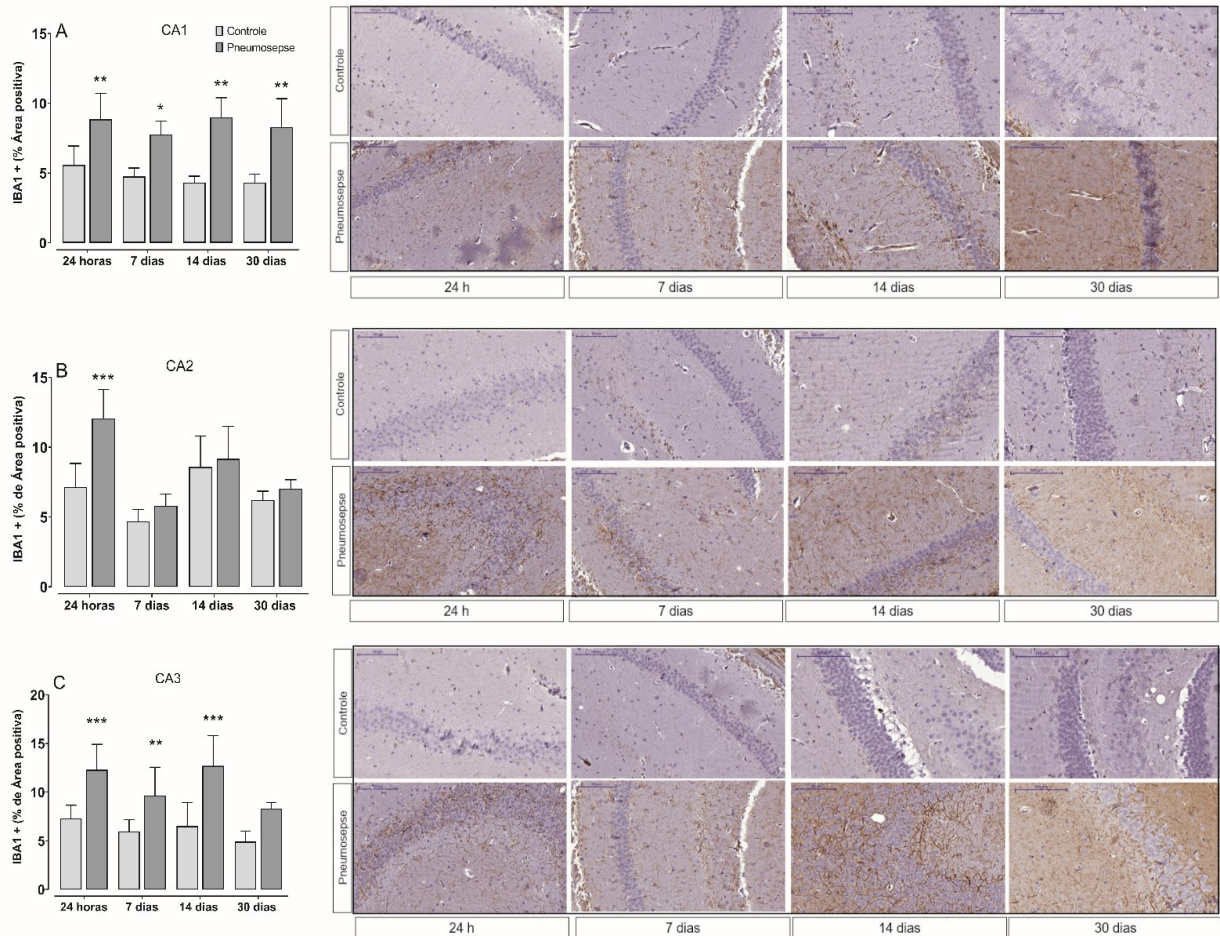
A ANOVA de duas vias indicou um aumento significativo de área para células positivas (IBA1) em todas as regiões analisadas no hipocampo: CA1 [ $F_{(3,40)} = 15,14; p < 0,001$ ], CA2 [ $F_{(3,40)} = 10,20; p < 0,001$ ] e CA3 [ $F_{(3,40)} = 19,34; p < 0,001$ ], representados por meio das Figura 25A, 25B, 25C.

As comparações *post hoc* demonstraram que na área CA1 houve um aumento significativo e sustentado da porcentagem (%) da área positiva para IBA1 nos animais sépticos, que perpassou 24h ( $p > 0,01$ ), 7 dias ( $p > 0,05$ ), 14 dias ( $p < 0,05$ ) e 30 dias ( $p < 0,05$ ). Na região CA2, observou-se um aumento na área positiva para IBA1 somente em 24h após o insulto ( $p < 0,001$ ).

Adicionalmente, observou-se aumento da % da área na região CA3 em 24h ( $p < 0,001$ ), 7 dias ( $p < 0,01$ ) e 14 dias ( $p < 0,001$ ).

De modo suplementar, foram selecionadas, algumas fotomicrografias (Figura 26) na qual destacam-se alguns achados patológicos em animais com pneumosepse, quando comparados ao grupo controle. Foi observado em algumas fotomicrografias de animais sépticos espaços perivasculares de Virchow-Robin alargados dentro e fora do hipocampo, assim como edema em substância branca. Adicionalmente, observou-se grandes áreas positivas para IBA1 e células microgliais permeando o componente neuronal e também regiões perivasculares.

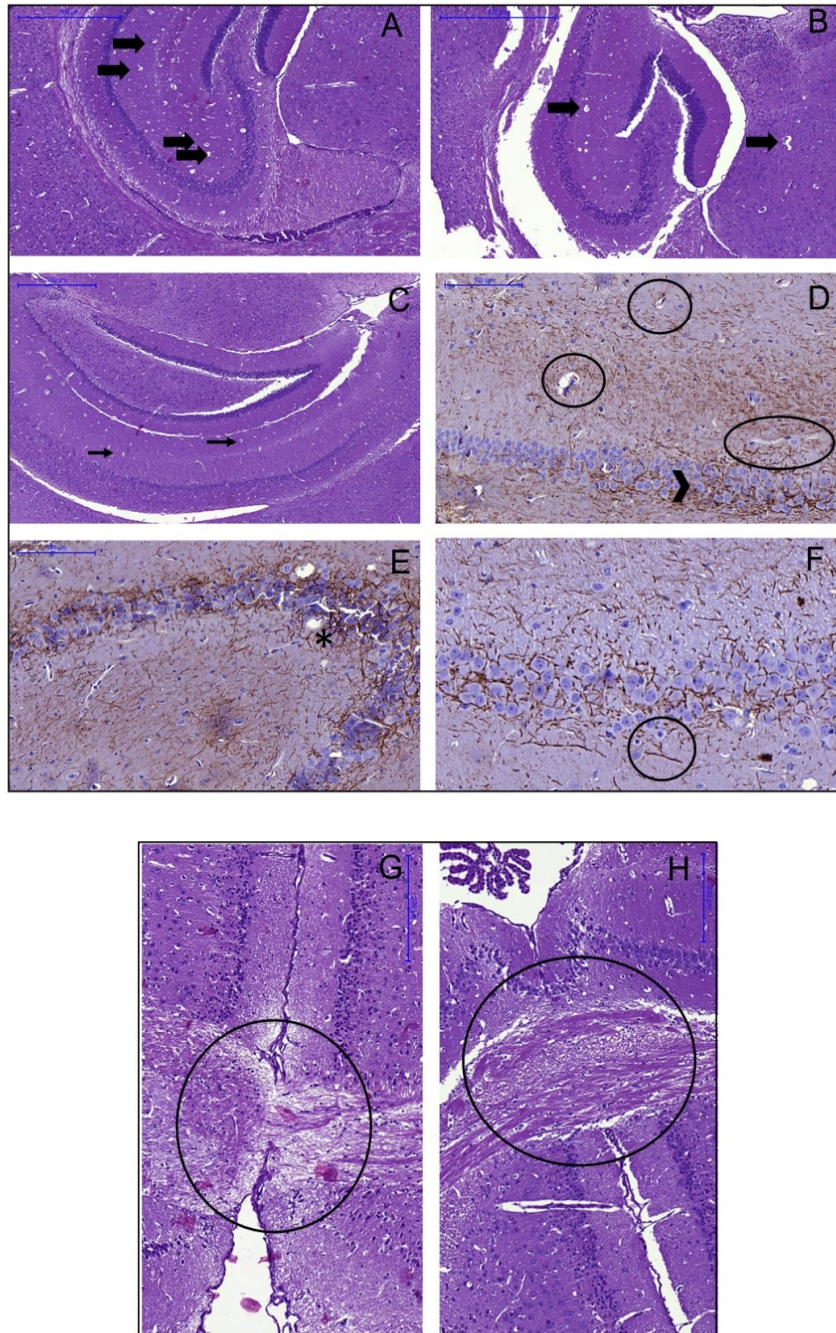
Figura 25 - Análise da área positiva para IBA1 no hipocampo após a indução de pneumosepse com *Klebsiella pneumoniae*



Legenda: A figura demonstra, em um painel imunohistoquímico representativo de fotomicrografias (aumento de 200 x) o percentual de área com células positivas para IBA1, um marcador celular de ativação microglial no hipocampo (CA1, CA2 e CA3) A: área CA1, B: área CA2, C: área CA3. n=6 animais/grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste pós teste de Tukey e foi considerado significativo \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM.



Figura 26 - Demonstração qualitativa de fotomicrografias com achados fisiológicos e patológicos em animais controles e sépticos



Legenda: A: Presença de espaços perivasculares de Virchow-Robin alargados em animais com pneumosepse (setas); B: Espaços perivasculares alargados estão frequentemente presentes nos camundongos com pneumosepse, dentro do hipocampo (seta) e também fora dele (seta); C: Imagem do hipocampo de caso controle. Observa-se que, em comparação com casos pneumosepse, os espaços vasculares de Virchow-Robin são inconspícuos (indicados por setas); D: em camundongos com pneumosepse, as células microgliais não estão somente presentes e permeando o componente neuronal hipocampal (seta) mas também, frequentemente, em regiões perivasculares (círculos); E: Micróglia intensamente ramificada entremecendo células neuronais do hipocampo em animal com pneumosepse (asterisco). F: célula microglial individual com prolongamentos marcados pela imunopositividade para Iba-1; G: fotomicrografia de animal com pneumosepse - observa-se estroma frouxo/edematoso em substância branca de corpo caloso (área circulado em preto), no animal controle, o corpo caloso encontra-se preservado, sem alterações histológicas significativas.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o modelo de pneumosepse por inoculação intratraquel de *Klebsiella pneumoniae* resultou em aumento na permeabilidade da BHE, infiltração de neutrófilos em regiões encefálicas, aumento de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo e córtex pré-frontal, bem como ativação microglial em regiões hipocampais. Além disso, foram observadas alterações relacionadas a disfunções neurológicas, como comportamentos tipo-depressivo ansioso, e de memória a curto prazo. Estas últimas características, em especial, relacionam-se fortemente aos estudos clínicos, os quais demonstram que os sobreviventes de sepse apresentam aumento na prevalência de problemas relacionados à saúde mental e distúrbios neuropsiquiátricos como ansiedade, depressão e alterações cognitivas a curto e longo prazo, mesmo após a resolução do quadro séptico (IWASHYNA et al., 2010; PRESCOTT; ANGUS, 2018).

Apesar da principal causa de sepse ser a pneumonia, o modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP), ainda é um dos modelos mais explorados em relação às alterações cognitivas-emocionais e neuroinflamatórias na sepse (KINGSLEY; BATH, 2016; GONÇALVES et al., 2017; BARICHELLO et al., 2019; SAVI et al., 2020; DAL-PIZZOL et al., 2021).

Adicionalmente existem inúmeros estudos de endotoxemia por LPS relacionados também a disfunções cognitivas e comportamentos tipo-depressivo, ansioso e alterações de memória. Essas disfunções, muitas vezes, estão relacionadas ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no plasma e no SNC (BARICHELLO et al., 2019; SAVI et al., 2020; DAL-PIZZOL et al., 2021). No entanto, é importante pontuar que o modelo de LPS não pode ser considerado como sepse, uma vez que apresenta abordagem translacional limitada e fragilidade fisiopatológica importante, visto que o curso das alterações inflamatórias e imunológicas não são semelhante à sepse humana, como por exemplo, o aumento de citocinas de maneira aguda que não perduram ao longo do tempo, assim como a não repercussão hemodinâmica e recuperação rápida do animal frente ao insulto (RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007; CAVAILLON; SINGER; SKIRECKI, 2020)

Em contrapartida, modelos que abordem a sepse pulmonar e explorem repercussões comportamentais e neuroinflamatórias são ainda pouco descritos na literatura, a despeito dos acometimentos pulmonares representarem mais de 50% das ocorrências sépticas no mundo, e a

*Klebsiella pneumoniae* ser uma das principais bactérias gram-negativas responsáveis pela sepse em ambientes hospitalares (ALBERTI et al., 2002; SARK et al., 2018).

Desta maneira, a escolha do modelo de sepse de foco pulmonar induzida por *Klebsiella pneumoniae* destaca-se, primeiramente, pelo fato do pulmão apresentar uma grande superfície epitelial em contato direto com o meio externo, servindo como órgão-alvo primário para muitos patógenos, como bactérias por exemplo, podendo causar lesão pulmonar inflamatória aguda e até mesmo síndrome da resposta inflamatória aguda (SDRA). Complementarmente, o sistema respiratório tem um papel imunológico crucial, uma vez que abriga células inatas e adaptativas, com potente resposta imunológica (REZOAGLI et al., 2017; KUMAR, 2020).

Além disso, o modelo de pneumosepse induzida por inoculação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae* mostrou-se extremamente reprodutível, padronizado e com significativa validade translacional de face e constructo (SORDI et al., 2013; HOREWICZ et al., 2015; SOARES et al., 2006; De STOPPELAAR et al., 2015; CZAIKOSKI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2017; PROBST et al., 2019). Neste sentido, este estudo ratificou estes enfoques através das alterações de escore clínico, disseminação bacteriana, disfunção orgânica, recrutamento celular, perfil hematológico, alterações comportamentais, bem como pela condição neuroinflamatória, demonstrada nos resultados obtidos. Nesta perspectiva, em particular, o quadro de neuroinflamação após o episódio séptico pode estar relacionado às condições clínicas dos pacientes que apresentam alterações comportamentais persistentes, mesmo após a resolução do quadro infeccioso e a alta hospitalar.

De modo complementar, o escore clínico utilizado neste modelo experimental alude significativamente ao fator prognóstico na prática clínica, que é fundamental na predição de mortalidade, morbidade e estratificação dos pacientes. Escalas como o “*Acute Physiology and Chronic Health Evolution*” e “*Sepsis related Organ Failure Assessment*” (APACHE E SOFA, respectivamente) são utilizados rotineiramente no âmbito das UTIs, a fim de facilitar a avaliação qualitativa e permitir comparações com base de dados em grande escala (SEYMOUR et al., 2016; GONÇALVES et al., 2017; KHWANNIMIT et al., 2019). Nesta ótica, o estudo de Gonçalves et al., (2017), associou um maior escore clínico dos animais a uma maior probabilidade de mortalidade, ao grau de disseminação bacteriana e aos níveis elevados de citocinas inflamatórias no modelo de pneumosepse. Neste estudo, observou-se que nos primeiros dias os animais do grupo pneumosepse apresentaram escores clínicos elevados sendo observada uma recuperação após 6 dias da indução do modelo.



Adicionalmente, neste protocolo experimental, o teste do ninho demonstrou uma baixa pontuação tanto a curto como a longo prazo. A construção de ninhos é um comportamento inato que os murinos executam para o conforto, termorregulação, por exemplo. Em relação a esses achados, sugere-se que possa ter ocorrido devido a diminuição do bem-estar geral dos animais com pneumosepse, porém, várias situações decorrentes da diminuição na construção do ninho poderiam estar presentes nesse modelo, como dor persistente, visto que os modelos de sepse podem envolver um alto risco de dor devido a inflamação e hiperalgesia mediada por endotoxemia (CARPENTER et al., 2019). Além disso, a temperatura do animal, não foi mensurada neste estudo, porém a elevação da temperatura corporal, consequente a sepse, também poderia estar associada a uma diminuição na construção de ninhos.

Já na seara fisiopatológica, os resultados deste estudo demonstraram que, a partir da pneumosepse, um processo inflamatório sistêmico foi instalado, demonstrado por meio do aumento da permeabilidade vascular em vários tecidos (pulmão, fígado, coração, intestino, encéfalo). De fato, foi possível observar um intenso processo inflamatório pulmonar, haja vista o infiltrado neutrofilico, indicado pela atividade de MPO no pulmão, por até 7 dias após o insulto. Além disso, foi observado aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  no tecido pulmonar e encefálico, além dos níveis de IL-6, que aumentaram tardiamente, a partir do 14º dia, permanecendo elevados até 30 dias.

De fato, houve um aumento de citocinas nos tecidos analisados em diferentes tempos, com provavelmente, cinéticas e repercussões diferentes em cada órgão (pulmão e encéfalo). Estes achados sugerem que as citocinas podem ser produzidas e liberadas por células residentes dos órgãos estudados e contribuir para a disfunção tecidual.

As inflamações orgânicas localizadas, podem iniciar uma síndrome da resposta inflamatória localizada (LIRS, do inglês “*localized inflammatory response syndrome*”). Essa pode ser decorrente de uma imunossupressão que contribui para a entrada de bactérias, falência de fagocitose nos tecidos e, liberação de moléculas inflamatórias, como citocinas, óxido nítrico, enzimas proteolíticas, entre outros (GONÇALVES et al., 2017).

Neste contexto, sugere-se que a falência múltipla orgânica na sepse possa ser decorrente do somatório de inflamações locais (tecduais). Este estudo sugere que altas concentrações de citocinas tecduais podem contribuir para a inflamação localizada e ser um dos fatores responsáveis pela síndrome inflamatória sistêmica da sepse.

Paralelamente, foram observadas alterações sanguíneas características da sepse, como resposta neutrofilica importante e aumento do número de leucócitos. Além disso, observou-se uma tendência a plaquetopenia em 30 dias nos animais com pneumosepse, sugerindo distúrbio de coagulação.

Simultaneamente, os animais sépticos demonstraram diminuição de consumo de ração, água e perda de peso significativa quando comparado ao grupo controle (falso-inoculado), alinhando nossos resultados com estudos prévios (GONÇALVES et al., 2017; DENSTAEDT et al., 2019; GOLDIM et al., 2020).

É importante destacar que ocorreu uma recuperação dos animais em relação ao evento séptico, principalmente a partir do 14º dia, visto que houve recuperação de consumo (ração e água) e peso corporal desses animais, assim como melhora do escore clínico e a não evidência de disseminação bacteriana sistêmica. Por isso, os dias 14º e 30º foram, também escolhidos para avaliação temporal, neste estudo.

Dessa forma, as primeiras etapas desse trabalho foram capazes de evidenciar que o modelo experimental de pneumosepse tem um potencial translacional em mimetizar alterações clínicas relacionadas à sepse pulmonar em humanos, ou seja, o modelo em questão preenche o requisito científico relacionado a validade de face.

Uma vez lançados e comprovados os fundamentos relacionados à validade de face do modelo experimental, os resultados deste estudo igualmente apresentaram um conjunto de alterações neurocomportamentais tanto a curto como a longo prazo. De fato, o mesmo fenômeno é observado em estudos clínicos, nos quais os pacientes sépticos apresentam um risco aumentado de declínio cognitivo e distúrbios neuropsiquiátricos (IWASHYNA et al., 2010; PRESCOTT; ANGUS, 2018).

No quesito translação, o modelo CLP, por exemplo, apresenta limitações intrínsecas, como cirurgia extensa, dor e hipomobilidade pós-operatória. Portanto, a avaliação dos comportamentos tipo-depressivo e ansioso é limitada em fases iniciais e agudas neste modelo experimental, restringindo, de certa forma, sua utilização para análise comportamental/emocional apenas em fases tardias e suas consequências a longo prazo (DYSON; SINGER et al., 2009; DEJAGER et al., 2011; DAL-PIZZOL et al., 2021).

Já em relação a indução de endotoxemia por LPS, esses comportamentos restringem-se a avaliações agudas (até 48h) nos animais, que geralmente resolvem espontaneamente após esse período (DAL-PIZZOL et al., 2021). Dessa maneira, doses únicas de LPS, parecem não mimetizar

o que é observado ao longo do tempo em pacientes sépticos, na qual a incidência de disfunções neuropsiquiátricas é prevalente a longo prazo (MACHADO; AZEVEDO, 2018).

Barichello e colaboradores (2019), Savi e colaboradores (2020), Dal-Pizzol e colaboradores (2021) demonstraram, em recentes revisões sistemáticas, que comportamentos tipo-depressivo, ansioso e disfunções relacionadas à memória são identificados desde o início, até vários meses (40-50 dias) em modelos de sepse em murinos, porém essas disfunções são avaliadas, majoritariamente em modelos de CPL e LPS.

A fim de potencializar a consistência dos parâmetros comportamentais avaliados, alguns autores sugerem que mais de um teste comportamental seja aplicado e que, adicionalmente, drogas clássicas que revertam esses comportamentos devam ser utilizadas para verificar a especificidade da observação do fenótipo encontrado (DAL-PIZZOL et al., 2021).

Neste estudo, não foram utilizadas drogas clássicas como controle, indicando certa limitação experimental. Todavia, Dantzer e colaboradores (2008), referem que as análises comportamentais tipos depressivo e ansioso podem ser influenciadas não apenas por antidepressivos ou benzodiazepínicos, mas também por manipulações que potencialmente podem induzir fenótipos “depressivos” ou “ansiosos”, como ativação imunológica, por exemplo. Em vista disso, com a finalidade de reparar algum grau de modicidade no quesito farmacológico, foram realizados dois testes referentes a cada tipo de comportamento (tipo-depressivo e ansioso), a fim de confirmar os desfechos avaliados.

Por certo, os testes utilizados em animais exibem limitações importantes para a avaliação da depressão, visto que sua natureza é heterogênea e multifacetada, sendo diagnosticada com base em um grupo complexo de sintomas altamente variáveis, que incluem fenômenos cognitivos, emocionais, homeostáticos e psicomotores. Entretanto, apenas um subconjunto destes sintomas podem ser analisados objetivamente em roedores (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; NESTLER; HYMAN, 2010).

Todavia, existem muitos testes comportamentais para o estudo da depressão e ansiedade. Esses modelos dependem geralmente de múltiplas “leituras” comportamentais, que podem ser extrapoladas como um parâmetro do estado emocional do animal (NESTLER; HYMAN, 2010). Neste sentido, a opção para estudar estes comportamentos é a utilização de vários testes, a fim de que diferentes facetas da mesma característica sejam avaliadas, obtendo-se, então, uma imagem mais clara dos paradigmas avaliados (RAMOS, 2008).

Neste estudo, os animais foram submetidos à diversos paradigmas comportamentais. Foi demonstrado que o grupo pneumosepse apresentou aumento no tempo de imobilidade no TSC, em todos os períodos avaliados, sendo essa uma estratégia de enfrentamento para o estresse agudo inescapável, na qual os animais podem eleger diferentes estratégias de enfrentamento (ativas ou passivas – economia de energia ou “desespero comportamental”) (STERU et al., 1985; COMMONS et al, 2017). Adicionalmente, foi observado diminuição no tempo de autolimpeza no TBS, sugerindo diminuição da motivação. O comportamento de autolimpeza é inato aos roedores, e características como viscosidade e palatabilidade da sacarose no dorso do animal induzem tal comportamento (PLANCHEZ et al., 2019; PIZZAGALLI, 2014).

Paralelamente, os animais permaneceram um maior tempo nos braços fechados (LCE) e um menor tempo no centro do aparato avaliado no TCA, sugerindo que esses não tiveram a tendência de assumir riscos, demonstrando um possível efeito ansiogênico desencadeado pela pneumosepse. Esses testes mensuram as respostas não condicionadas, embasadas no conflito inato entre impulso natural dos animais de explorar novidades e sua aversão por ambientes abertos (BOURIN, 2007; ENNACEUR; CHAZOT et al; 2016, BALDWIN et al, 2017).

Alguns mecanismos são propostos para o aparecimento de alterações comportamentais em modelos de sepse. Neste estudo, pode-se constatar que houve aumento da permeabilidade da BHE em 24h no hipocampo e córtex pré-frontal após a indução da pneumosepse, com ativação de MPO no córtex pré-frontal, indicando infiltração de neutrófilos.

Neste sentido, os mediadores inflamatórios como citocinas, leucócitos e EROs apresentam efeito deletério nas células do endotélio vascular, incluindo a ativação de metaloproteinases (MMPs) – como MMP-3, MMP-7, MPP-9 – assim como lesão das junções intracelulares (claudinas e ocludinas) por meio da modificação estrutural do citoesqueleto da BHE, resultando em lesão, vazamento e edema tecidual (LEE; SLUTSKY et al., 2010; YAZDAN-ASHOORI et al., 2011; BARICHELLO et al., 2020).

De fato, estes mecanismos parecem estar associados à insultos neuroinflamatórios na fase inicial da sepse (COMIM et al., 2011; OZCAN et al., 2015; ANDONEGUI et al., 2018). Comim e colaboradores (2011), mostraram um aumento da atividade de MPO e de citocinas pró-inflamatórias no encéfalo e, simultaneamente, um comprometimento da integridade da BHE 24h após a indução de sepse induzida por CLP. A ruptura da BHE parece facilitar a entrada de células imunológicas periféricas e de citocinas para o SNC, desencadeando ou exacerbando a ativação

de células microgлияis (DANIELSKI et al., 2017; WESTHOFF et al., 2019; BARICHELLO et al., 2020).

Apesar de estudos demonstrarem o envolvimento da BHE no mecanismo de neuroinflamação e alterações comportamentais em modelos animais, o aumento na permeabilidade e as alterações das junções endoteliais parecem ocorrer de forma breve e aguda. Nesse sentido, outros mecanismos têm sido propostos para a ocorrência de inflamação e lesão no SNC. Os vasos linfáticos menígeos são reconhecidos como participantes na complexa circulação de conteúdos solúveis entre LCR e fluido intersticial (via “glifática”). Estes, estão funcionalmente ligados ao influxo/efluxo paravascular do LCR (MESQUITA; FU; KIPNIS, 2018).

Dessa maneira, estudos sugerem que a atividade dos vasos linfáticos menígeos pode alterar a acessibilidade de neuromoduladores imunológicos transmitidos pelo LCR ao parênquima cerebral alterando seus efeitos no SNC, como por exemplo, a disfunção associada a sinalização de citocinas no parênquima cerebral (MESQUITA; FU; KIPNIS, 2018).

Alguns estudos sugerem que a ativação das células microgлияis no hipocampo origina uma interação menos robusta entre astrócitos e unidade neuronal, resultando em uma baixa manutenção de sinapses neuronais, com aumento da capacidade fagocítica microgлияl nas sinapses e, inclusive, à morte neuronal, podendo estar relacionada, também, a disfunções cognitivas e comportamentais (AZEVEDO et al., 2013; MORAES et al., 2015; BARICHELLO et al., 2020, DE SOUZA et al., 2021).

Neste estudo foi observada ativação microgлияl persistente em áreas hipocampais, e células microgлияis presentes não somente, permeando células neuronais, mas também, em regiões perivasculares, corroborando, deste modo, com outros estudos em modelos experimentais de sepse (ANDERSON et al., 2015; GAO et al., 2017, TRZECIAK et al., 2019; MICHELS et al., 2020). Neste sentido, sugere-se que microgлия perivascular pode ter contribuído para a disfunção no SNC, neste modelo, ao liberar citocinas que comprometem a integridade do endotélio vascular.

De acordo com AZEVEDO et al., (2013), níveis elevados de IL1- $\beta$  no hipocampo parecem estar associados a maior ativação microgлияl, fomentando o processo de neuroinflamação. Paralelamente, neste estudo, os níveis não só de IL1- $\beta$ , como também de TNF- $\alpha$  estavam significativamente aumentados no hipocampo por até 14 dias, e no córtex pré-frontal

por até 7 dias, após a indução da pneumosepse. Ou seja, estas citocinas mantiveram-se elevadas de maneira aguda.

Em contrapartida, os níveis de IL-6 aumentaram a partir do 14º dia, mantendo-se elevados até o último período avaliado (30 dias). Apesar desta citocina ter um efeito pleiotrópico, neste modelo, sugere-se que esta tenha sido um marcador pró-inflamatório no SNC e um indicador potencial de inflamação persistente, visto os níveis excessivos de maneira tardia no hipocampo e córtex pré-frontal, podendo estar associada à alterações neurocomportamentais. Além disso, pode ter ocorrido o aumento dos níveis dessa citocina devido produção e liberação a partir da microglia. De fato, outros estudos, referem o papel da IL-6 em lesões graves com infecções associadas, repercutindo em déficits cognitivos, alterações comportamentais e diminuição da neurogênese no hipocampo (RICHWINE et al., 2008; BURTON; JOHNSON, 2012).

Além do aumento de citocinas, principalmente IL-6, e ativação microglial persistente (área CA1 do hipocampo), outros mecanismos podem estar relacionados à manutenção dos prejuízos neurocomportamentais, neste estudo, como aumento de EROs, disfunção mitocondrial, alteração de neurotransmissores, disfunções sinápticas, entre outros.

No estudo de Denstaedt e colaboradores (2019), foi observado um aumento na expressão de CXCL1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC no encéfalo dos camundongos 72h após a indução de pneumosepse ( $1 \times 10^4$  /UFC intranasal). Neste mesmo estudo, 14 dias após a indução, a expressão de TNF e KC mantiveram-se elevadas, evidenciando a presença da neuroinflamação tardia, mesmo após a resolução do quadro séptico dos camundongos, corroborando com nossos resultados. Somado a isso, Singer e colaboradores (2016) demonstraram que a sepse induzida por CLP resultou em neuroinflamação, infiltração de monócitos e neutrófilos e ativação microglial sustentada (até 50 dias).

Níveis persistentemente elevados de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-6 podem contribuir significativamente para as consequências a longo prazo na sepse, resultando em alterações comportamentais persistentes e inclusive, em perda neuronal (SEMMLER et al., 2007; LAWSON et al., 2013; FISCHER et al., 2015). Ademais, os estudos relatam que as regiões mais afetadas em condições sépticas são hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala (PRAGER et al., 2013; DAL-PIZZOL et al., 2021).

No estudo de Sui e colaboradores (2016), ratos submetidos à CLP apresentaram aumento na expressão de IBA-1, IL-1 $\beta$  e NLRP-3 no hipocampo, assim como comprometimento

da memória espacial. No presente estudo, foi observado déficit de memória a curto prazo em 14 e 30 dias após o evento séptico, sugerindo que seus efeitos perpetuam ao longo do tempo. Neste sentido, alguns trabalhos têm relatado alterações cognitivas a longo prazo em modelos sépticos, como no estudo de Magno e colaboradores (2013), no qual a instilação intratraqueal de *Pseudomonas aeruginosa* ( $1 \times 10^5$  /UFC) foi capaz de desencadear déficit na memória aversiva (13 à 50 dias) após o procedimento de indução (MAGNO et al, 2013).

Alguns estudos clínicos também demonstram que os sobreviventes à sepse apresentam déficits no aprendizado verbal e na memória (variando entre 6 meses à 2 anos), assim como redução significativa do volume hipocampal à ressonância magnética (SEMMLER et al., 2013).

Nesta perspectiva, os resultados deste estudo demonstraram correlações estatísticas entre o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-6 no hipocampo e diminuição do tempo no centro no TCA, menor porcentagem de tempo nos braços abertos no teste do LCE, maior tempo de imobilidade no TSC e, menor tempo de autolimpeza no TBS. Analisados em conjunto, estes dados sugerem que a presença persistente da neuroinflamação em tecidos encefálicos após a sepse pode estar fortemente associada à alterações comportamentais.

De fato, a neuroinflamação persistente tem sido um mecanismo proposto na contribuição para a disfunção cerebral crônica em sobreviventes à sepse, uma vez que são conhecidas as relações entre aumento dos níveis dos marcadores inflamatórios circulantes e condições de transtorno depressivo, ansiedade, fadiga e diminuição da qualidade de vida nos pacientes que sobreviveram à sepse (YENDE et al, 2008; PRESCOTT, ANGUS et al, 2018).

A despeito dos resultados contundentes, este estudo possui algumas perspectivas que demandam considerações. Uma delas diz respeito sobre a utilização de camundongos considerados adultos jovens, uma vez que a maior incidência de eventos pós-sepse - agudos ou tardios - como encefalopatia séptica, alterações cognitivas e distúrbios neuropsiquiátricos, por exemplo, ocorrem em indivíduos idosos (D'AVILA et al., 2019). Este fato sugere um papel importante do envelhecimento no processo da inflamação sistêmica, ativação da microglia e disfunções neuropsiquiátricas e neurodegenerativas associadas à sepse (D'AVILA et al., 2019).

Adicionalmente, a maioria dos estudos publicados sugere uma recuperação tempo-dependente dos distúrbios comportamentais, apesar de algumas alterações moleculares encefálicas parecerem persistir (DAL-PIZZOL et al., 2020). Nesta lógica, estudos futuros poderiam adicionar um segundo insulto pulmonar a fim de criar uma comorbidade paralela e imbuir o modelo experimental de maior característica translacional (CAVAILLON; SINGER;

SKIRECKI, 2020). Também seria interessante avaliar um interstício temporal acima de 30 dias, com o intuito de verificar a persistência das alterações de comportamento, associadas ou não, à neuroinflamação neste modelo.

Por fim, ressalta-se que os dados obtidos neste trabalho demonstram que o modelo de pneumosepse induzida por instilação de *Klebsiella Pneumoniae* é capaz de desencadear comportamentos tipos-depressivo e ansioso, alterações de memória, e respostas neuroinflamatórias no hipocampo e no córtex pré-frontal de camundongos.

Além disso, este estudo evidenciou a associação entre o perfil neuroinflamatório em áreas encefálicas com distúrbios de comportamento, o que é de fundamental importância para ampliar a compreensão dos complexos mecanismos centrais subjacentes à disfunção do SNC a curto e longo prazo na sepse, possibilitando a avaliação de abordagens para controle da neuroinflamação, alterações psiquiátricas e cognitivas na população de pacientes com sepse.



## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, o presente estudo conclui que:

1) O modelo de pneumosepse induzida pela instilação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae* apresentou características translacionais clínicas como mortalidade, aumento do escore clínico e injúrias em órgãos distais ao local da lesão (disfunção renal, com aumento de permeabilidade vascular tecidual);

2) O modelo de pneumosepse induzida pela instilação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae* produziu alterações comportamentais tipo-depressivo, ansioso e de memória a curto prazo, dentro do interstício de 30 dias;

3) O modelo de pneumosepse induzida pela instilação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae* aumentou a atividade da MPO nos pulmões por até 7 dias e por 24 horas no córtex pré-frontal;

4) O modelo de pneumosepse induzida pela instilação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae* aumentou agudamente a permeabilidade vascular tecidual e da BHE;

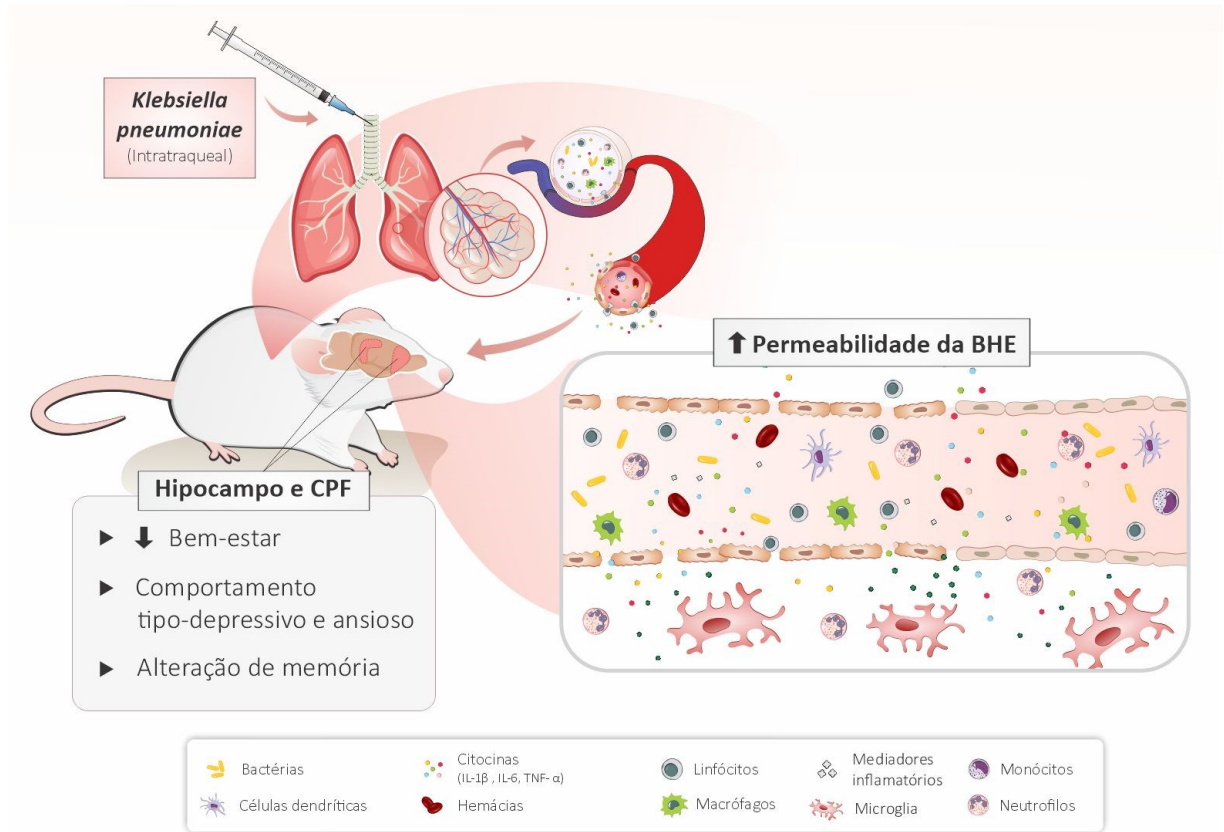
5) O modelo de pneumosepse induzida pela instilação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae* resultou em um aumento expressivo dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) em regiões encefálicas, como o hipocampo e córtex pré-frontal, pontuando um perfil neuroinflamatório agudo e tardio;

6) O modelo de pneumosepse induzida pela instilação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae* resultou em correlações significativas entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo com os comportamentos tipo-depressivo e ansioso dos animais;

7) O modelo de pneumosepse induzida pela instilação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae* resultou na ativação microglial de áreas hipocampais.

Em suma, este estudo demonstrou que a pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* promoveu resposta neuroinflamatória e comportamentos tipo-depressivo e ansioso, assim como alterações de memória; bem como, indicou que a inflamação no hipocampo parece estar associada com tais comportamentos (Figura 27).

Figura 27 - Pneumosepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* em camundongos: caracterização comportamental e perfil neuroinflamatório



Legenda: Representação esquemática dos principais achados do estudo. O modelo de pneumosepse induzida por instilação de *Klebsiella pneumoniae* é capaz de desencadear respostas sistêmicas, neuroinflamatórias e repercussões comportamentais, demonstrando uma importante abordagem translacional. Fonte: Planejamento do esquema da figura de autoria própria, e ilustração realizada por ilustradora Priscila B. Rosa pelo software CorelDraw e Mind the Graph, 2021.

## REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, N.K. et al. Critical care and the global burden of critical illness in adults. **The Lancet**, v. 376, n. 9749, p.1339-1346, 2010.
- AGUIRRE, Y.P.; PÁRAMO, J.A. Endothelial cell and hemostatic activation in relation to cytokines in patients with sepsis. **Thombosis Research**, v. 94, n.2, p.95-101, 1999.
- ALBERTI, C et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Medicine**, v. 28, n.2, p. 108-121, 2002.
- ANDERSON, B. J. et al. Admission plasma levels of the neuronal injury marker neuron-specific enolase are associated with mortality and delirium in sepsis, **Journal of Critical Care**, v. 36, p. 18–23, 2016.
- ANDERSON, S. T. et al. Lipopolysaccharide-induced sepsis induces long-lasting affective changes in the mouse. **Brain, behavior, and immunity**, v. 43, p. 98-109, 2015.
- ANDONEGUI, G. et al. Targeting inflammatory monocytes in sepsis-associated encephalopathy and long-term cognitive impairment. **JCI Insight**, v. 3, n. 9, e99364, 2018.
- ANGUS, M.D; POLL, M.D. Severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**, v.369, p.840-851, 2013.
- AZEVEDO, E.P. et al. Activated microglia mediate synapse loss and short-term memory deficits in a mouse model of transthyretin-related oculoleptomeningeal amyloidosis. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. e789, 2013.
- BALDWIN, D. S. et al. Pharmacotherapy in generalized anxiety disorder: novel experimental medicine models and emerging drug targets. **CNS Drugs**, v. 31, n. 4, p. 307-317, 2017.
- BARICHELLO, T. et al. Long-term cognitive outcomes after sepsis: a translation systematic review. **Molecular Neurobiology**, v.56, n.1, p.186-251, 2019.
- BARICHELLO, T. et al. The blood-brain barrier dysfunction in sepsis. **Tissue barriers**, v. 9, n. 1, 1840912, 2021.
- BELZUNG, C.; LEMOINE, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. **Biology of mood & anxiety disorders**, v.1, n. 1, p. 9, 2011.
- BIESMANS, S. et al. Systematic analysis of the cytokine and anhedonia response to peripheral lipopolysaccharide administration in rats. **Biomed Research International**, v. 131, p. 1-14, 2016.
- BONE, R.C, BALK, R.A, CERRA, F.B et al. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and

guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Critical Care Medicine**, v.20, n.6, p.864–874, 1992.

BORGES, R. C. et al. Physical activity, muscle strength, and exercise capacity 3 months after severe sepsis and septic shock. **Intensive Care Medicine**, v. 41, n. 8, p. 1433–1444, 2015.

BORN, J. et al. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. **Journal of immunology**, v. 158, n. 9, p. 4454 - 4464, 1997.

BOURIN, M. et al. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.21, n.6, p.567–574, 2007.

BOWTON, D. L. et al. Cerebral blood flow is reduced in patients with sepsis syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 17, n.5, p. 399-403, 1989.

BOZZA, F. A. et al. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. **Shock**, v. 39, n. 1, p. 10-16, 2013.

BURKHART, C. S.; SIEGEMUND, M.; STEINER, L.A. Cerebral perfusion in sepsis. **Critical Care**, v. 14, n. 2, p. 215, 2010.

BURTON, M. D.; JOHNSON, R.W. Interleukin-6 trans-signaling in the senescent mouse brain is involved in infection-related deficits in contextual fear conditioning. **Brain Behavior and Immunity**, v. 26, n. 5, p. 732-738, 2012.

CALSAVARA, D. H. et al. Late Anxiety-like behavior and neuroinflammation in mice subjected to sublethal polymicrobial sepsis. **Neurotoxicity Research**, v. 24, n. 2, p. 103-108, 2013.

CANDELARIO-JALIL, E. et al. Matrix metalloproteinases are associated with increased blood-brain barrier opening in vascular cognitive impairment. **Stroke**, v. 42, n. 5, p. 1345-1350, 2011.

CARPENTER; K. C. The influence of pain and analgesia in rodent models of sepsis. **Comparative Medicine**, v.6, n. 69, p. 546-554, 2019.

CARSWELL, E. A. et al. An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of National Academy of Sciences of United State of America**, v. 72, n. 9, p. 3666–3670, 1975.

CAVAILLON, J. M.; SINGER, M.; SKIRECKI, T. Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads. **EMBO Molecular Medicine**, v. 12, n. 4, e10128, 2020.

CHAVAN, S. S. et al. HMGB1 mediates cognitive impairment in sepsis survivors. **Molecular Medicine**, v. 18, n. 1, p. 930-937, 2012.

CHOUSTERMAN, B.G; SWIRSKI, F.K; WEBER, G.F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. **Seminars in Immunopathology**, v.39, n.5, p.517– 528, 2017.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v.420, n.6917, p.885-891, 2012.

COMIM, C. M. et al. Traffic of leukocytes and cytokine upregulation in the central nervous system in sepsis. **Intensive Care Medicine**, v. 37, n.4, p. 711-718, 2011.

COMMONS, K.G. et al. The Rodent forced swim test measures stress-coping strategy, not depression-like behavior. **ACS Chemical Neuroscience**, v.8, n.5, p.955-960, 2017.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in pharmacological sciences**, v. 23, n. 5, p. 238–245, 2002.

CZAIKOSKI P. G. et al. Heme oxygenase inhibition enhances neutrophil migration into the bronchoalveolar spaces and improves the outcome of murine pneumonia-induced sepsis. **Shock**, v. 39, n.4, p. 389–396, 2013.

D'ÁVILA, J. C. et al. Aged-related cognitive impairment is associated with long-term neuroinflammation and oxidative stress in a mouse model of episodic systemic inflammation. **Journal of neuroinflammation**, v. 15, n. 28, 2018.

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, 2013.

DAL-PIZZOL, F. et al. What animal models can tell us about long-term psychiatric symptoms in sepsis survivors: a systematic review. **Neurotherapeutics**, n.6, 2021.

DANIELSKI, L. G. et al. Brain Barrier Breakdown as a Cause and Consequence of Neuroinflammation in Sepsis. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 1045-1053, 2018.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature reviews. Neuroscience**, v.9, n.1, p. 46–56, 2008.

DAVYDOW, D. S. et al. Symptoms of depression in survivors of severe sepsis: a prospective cohort study of older americans. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v.21, n.9, p. 887-897, 2013.

DE SOUZA, V.L. et al. Innate immune memory mediates increased susceptibility to Alzheimer's disease-like pathology in sepsis surviving mice. **Brain, behavior, and immunity**, v. 1591, n. 21, 2021.

DE STOPPELAAR, S. F. et al. The role of platelet MyD88 in host response during gram-negative sepsis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 13, n. 9, p. 1709-1720, 2015.

DEACON, R. J. Assessing nest building in mice. **Nature Protocol**, v.1, n. 3, p. 1117-1119, 2006.

- 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, 2011.
- DENSTAEDT, S. J. et al. Persistent neuroinflammation and brain specific immune priming in a novel survival model of murine pneumosepsis. **Shock**, v. 13, 2019.
- DEUTSCHMAN, C.S; TRACEY, K.J. Sepsis: current dogma and new perspectives. **Immunity**, v.40, p.463–475, 2014.
- DIETZEL, J. et al. Neutrophils in cerebrospinal fluid without pleocytosis. **European Journal of Neurology**, v.15, n.6, p. 634-636, 2008.
- Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Material Biológico. Classificação de agentes com base em seu risco biológico. Ministério da Saúde, 2004.
- DYSON, A. SINGER, M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? **Critical Care Medicine**, v. 37, p. 30-37, 2009.
- EFRON, P.A. et al. The future of murine sepsis and trauma research models. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 98, n. 6, p. 945-952, 2015.
- ENGELHARDT, B.; SOROKIN, L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. **Seminars in immunopathology**, v. 31, n. 4, p. 497–511, 2009.
- ENNACEUR, A. et al. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. II: Effects of piracetam and pramiracetam. **Behavioural Brain Research**, v. 33, n.2, 197–207, 1989.
- ENNACEUR, A.; CHAZOT, P.L. Preclinical animal anxiety research - flaws and prejudices. **Pharmacology Research & Perspective**, v. 4, n. 2, e00223, 2016.
- FINFER, S. R. et al. Sepsis NEJM 2013. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 29, p. 840–51, 2013.
- FISCHER, C. W. et al. Behavioral and systemic consequences of long-term inflammatory challenge. **Journal of neuroimmunology**, v. 288, p. 40-46, 2015.
- FLEISCHMANN, C. et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 3, p. 259–272, 2016.
- FLOHÉ, S.B. et al. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. **Journal of Leukocyte Biology**, v.79, n.3, p. 473-481, 2006.
- GAO, R. et al. Neuroinflammation-induced downregulation of hippocampal neuregulin 1-ErbB4 signaling in the parvalbumin interneurons might contribute to cognitive impairment in a

mouse model of sepsis-associated encephalopathy. **Inflammation**, v. 40, n. 2, p. 387- 400, 2017.

GASKILL, B. N. et al. Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. **Journal of visualized experiments**, v. 82, p. 51012, 2013.

GENTILE, L. F. et al. Identification and description of a novel murine model for polytrauma and shock. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 4, p. 1075 – 1085, 2013.

GEROULANOS, S.; DOUKA, E. T. Historical perspective of the word “sepsis”. **Intensive Care Medicine**, v. 32, n. 12, p. 2077, 2006.

GERY, I; GERSHON R. K.; WAKSMAN, B. K. Potentiation of cultured mouse thymocyte responses by factors released by peripheral leucocytes. **Journal of Immunology**, v.107, n. 6, p.1778–1780, 1971.

GEYE R, M.A.; MARKOU, A. Animal models of psychiatric disease. In: Bloom, F.E., and Kupfer, D.J., eds. **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**. New York: Raven Press, pp. 787–798, 1995.

GIL-MOHAPEL, J. et al. Hippocampal neurogenesis levels predict WATERMAZE search strategies in the aging brain. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75125, 2013

GIRARD, T. D. Survivors of Critical Illness. **Critical Care Medicine**, v. 38, n. 7, p. 1513–1520, 2013.

GODDARD S.; L.; ADHIKARI, N., K. The challenging task of improving the recovery of ICU survivors. **JAMA**, v. 315, n. 24, p. 2671-2672, 2016.

GOFTON, T.E; YONG, G.B. Sepsis-associated encephalopathy. **Nature Reviews. Neurology**, v. 8, n. 10, p. 577-566, 2012.

GOGOS, C. et al. Early alterations of the innate and adaptive immune statuses in sepsis according to the type of underlying infection. **Critical Care**, v. 14, n. 3, p. R96, 2010.

GOLDIM, M. P. S.; DELLA GIUSTINA, A.; PETRONILHO, F. Using evans blue dye to determine blood-brain barrier integrity in Rodents. **Current protocols in immunology**, v.126, n. 1, e83, 2019.

GOLDIM, M. P. S. Sickness behavior score is associated with neuroinflammation and late behavioral changes in polymicrobial sepsis animal model. **Inflammation**, v. 43, n. 3, p. 1019-1034, 2020.

GONÇALVES, M. C. et al. Experimental Sepsis Severity Score Associated to Mortality and Bacterial Spreading is Related to Bacterial Load and Inflammatory Profile of Different Tissues. **Inflammation**, v.40, n.5, p. 1553-1565, 2017.

GÜL, F. et al. Changing definitions of sepsis. **Journal of Anesthesiology and Reanimation**, v. 45, n. 3, p. 129-138, 2017.

GYAWALI, B.; RAMAKRISHNA, K.; DHAMOON, A. S. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. **SAGE Open Medicine**, v. 21, n. 7, 2019.

HANISCH, U. K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1387– 1394, 2007.

HANISCH, U. K. Proteins in microglial activation: inputs and outputs by subsets. **Current protein & peptide science**, v. 14, n. 1, p. 3–15, 2013.

HARPAZ, R.; DAHL, R. M.; DOOLING, K. L. Prevalence of immunosuppression among US adults, 2013. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 316, n. 23, p. 2547–2548, 2016.

HE, H. et al. NK cells promote neutrophil recruitment in the brain during sepsis-induced neuroinflammation. **Scientific Reports**, v.6, n. 27711, 2016.

HENSLEY, M. K.; PRESCOTT, H. C. Bad Brains, Bad Outcomes: Acute Neurologic Dysfunction and Late Death After Sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 46, n. 6, p. 1001–1002, 2018.

HOOGLAND, I. C. M. et al. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, p. 114, 2015.

HOOVER, D. B. et al. Impaired heart rate regulation and depression of cardiac chronotropic and dromotropic function in polymicrobial sepsis. **Shock**, v. 43, n. 2, p. 185-191, 2015.

HOREWICZ, V. et al. Fpr2/Alx activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in aorta and increases survival in a pneumosepsis model. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, n.746, p. 267–273, 2015.

HOSER, G.A. et al. Absolute counts of peripheral blood leukocyte subpopulations in intraabdominal sepsis and pneumonia-derived sepsis: a pilot study. **Folia histochemica cytobiology**, v. 50, n. 3 p. 420 – 426, 2012.

HOSOKAWA, K. et al. Clinical neurophysiological assessment of sepsis-associated brain dysfunction: A systematic review. **Critical Care**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2014.

HOTCHKISS, R.S Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. **Journal of Immunology**, v.166, n.11, p. 6952-6963, 2001.

HOTCHKISS, R.S et al. Sepsis and septic shock. **Nature Review and Diseases Primers**, v.30, n.2, p.16045, 2016.



- HOVENS, I. B. et al. Postoperative cognitive dysfunction and microglial activation in associated brain regions in old rats. **Neurobiology of learning and memory**, v. 118, p.74-79, 2015.
- INCE, C. et al. The endothelium in sepsis. **Shock**, v.45, n.3, p. 259-270, 2016.
- ISINGRINI, E. et al. Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4., p. 1-8, 2010.
- ISKANDER, K. N. et al. Cecal ligation and puncture-induced murine sepsis does not cause lung injury. **Critical Care Medicine**, v. 41, n.1, p. 159 – 170, 2013.
- IWASHYNA, T. J. et al. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 304, n. 16, p. 1787–1794, 2010.
- JOHNSON, G. B. et al. New insight into the pathogenesis of sepsis and the sepsis syndrome. **Surgery**, v. 137, n. 4, p. 393–395, 2005.
- JUSZCZAK, G. R.; SLIWA, A. T.; WOLAK, P. The usage of video analysis system for detection of immobility in the tail suspension test in mice. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 85, n.2, p. 332–338, 2006.
- KAPETANOVIC, R. et al. Mechanisms of TNF induction by heat-killed *Staphylococcus aureus* differ upon the origin of mononuclear phagocytes. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 300, n. 4, p. 850 - 859, 2011.
- KARP, C. L. Unstressing intemperate models: how cold stress undermines mouse modeling. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 6, p. 1069 – 1074, 2012.
- KAUKONEN, K. M. et al. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 13, p. 1308–1316, 2014.
- KEANEY, J. CAMPBELL, M. The dynamic blood-brain barrier. **The FEBS journal**, v. 282, n. 21, p. 4067–4079, 2015.
- KENNE, E. et al. Neutrophil depletion reduces edema formation and tissue loss following traumatic brain injury in mice. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, n. 19, 2012.
- KHWANNIMIT, B.; BHURAYANONTACHAI, R.; VATTANAVANIT, V. Comparison of the accuracy of three early warning scores with SOFA score for predicting mortality in adult sepsis and septic shock patients admitted to intensive care unit, **Heart lung**, v. 48, n. 3, p. 240-244, 2019.
- KILKENNY, C. et al. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. **British Journal of Pharmacology**, v.160, n.7, p.1577-1579, 2010.

- KIM, N.D; LUSTER, A.D. The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment. **Trends in Immunology**, v. 36, n.9, p. 547-555, 2015.
- KINGSLEY, M.K; BHAT, B.V. Differential paradigms in animals models of sepsis. **Current Infectious Disease Reports**, v.18, n.9, p.26, 2016.
- KRESS, J.; HALL, J. ICU-acquired weakness and recovery from critical illness. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 3, p. 287, 2014.
- KUMAR, V. et al. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 11, p. 1722, 2020.
- LAUKENS, D et al. Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 1, p. 117–132, 2016.
- LAWSON, M. A. et al. Interleukin-1 beta converting enzyme is necessary for development of depression-like behavior following intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide to mice. **Journal of neuroinflammation**, v. 10, n. 54, 2013.
- LEE, H. et al. Detailed cost analysis of care for survivors of severe sepsis. **Critical Care Medicine**. v. 32, n. 4, p.981-985, 2004.
- LEE, W. L.; SLUTSKY, A.S. Sepsis and endothelial permeability. **The New England journal medicine**, v. 363, n. 7, p. 689–691, 2010.
- LEWIS, A. J.; BILLIAR, T. R.; ROSENGART, M. R. Biology and metabolism of sepsis: innate immunity, bioenergetics, and autophagy. **Surgical Infection**, v. 17, n.3, p. 286–293, 2016.
- LEWIS, A. J.; SEYMOUR, C.W, ROSENGART, M.R. Current murine models of sepsis. **Surgical infections**, v. 17, n. 4, p. 385–393, 2016.
- LEVY, M. M.; FINK, M.P; MAERSHALL, J.C. et al. International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ ESICM/ACCP/ATS/SIS **Care Medicine**, v. 29, n.4, p.530–538, 2003.
- LEVY, M. M. et al. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. **Critical Care Medicine**. v. 38, n.4, p.367-374, 2009.
- LIAN, Y.J. et al. Ds-HMGB1 and fr-HMGB induce depressive behavior through neuroinflammation in contrast to nonoxid-HMGB1. **Brain, behavior, and immunity**, v. 29, p. 322-332, 2017.

- LICINIO, J.; MASTRONARDI, C.; WONG, M. Pharmacogenomics of neuroimmune interactions in human psychiatric disorders. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 5, p. 807-811, 2008.
- LOBO, Suzana Margareth et al. Mortalidade por sepse no Brasil em um cenário real: projeto UTIs Brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 31, n. 1, p. 1-4, 2019.
- MACHADO, G.B.S. et al. ExoU-induced vascular hyperpermeability and platelet activation in the course of experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumosepsis. **Shock**, v. 33, n. 3, p. 315-321, 2010.
- MACHADO F. R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis Prevalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **Lancet. Infectious diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180-1189, 2017.
- MACHADO, F.R.; AZEVEDO, L. C. P. Sepsis: a threat that needs a global solution. **Critical Care Medicine**, v. 46, n. 3, p. 454-459, 2018.
- MAEKAWA, T. et al. Cerebral circulation and metabolism in patients with septic encephalopathy. **The American Journal of Emergency and Medicine**, v. 9, n.2, p. 139-143, 1991.
- MAGNO, F. et al. Evaluation of inflammatory parameters and cognitive impairment in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumosepsis. **Critical Care**, v. 17(Suppl 4), p. 104, 2013.
- MANASI, N. et al. Rethinking animal models of sepsis – working towards improved clinical translation whilst integrating the 3Rs. **Clinical Science (London)**, v. 133, n. 13, p. 1715–1734, 2020.
- MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1546–1554, 2003.
- MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2014.
- MAZERAUD, A. et al. Neuroanatomy and physiology of brain dysfunction in sepsis. **Clinical Chest in Medicine**, v. 37, n.2, p. 333-345, 2016.
- MCARTHUR, R. A.; BORSINI, F. What do you mean by “Translational research”? An enquiry through animal and translational models for CNS drug discovery: Psychiatric disorders. In Animal and translational models for CNS drug discovery. Vol 1: **Psychiatric Disorders**. Edited by: McArthur RA, Borsini F. New York: Academic Press; xvii-xxxviii, 2008.
- MCDERMOTT A. J. et al. Role of interferon-gamma and inflammatory monocytes in driving colonic inflammation during acute *Clostridium difficile* infection in mice. **Immunology**, v. 150, n. 4, p. 468–477, 2017.

- MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Review Immunology**, n.1, v.2, p. 135-145, 2001.
- MELIEF, J. et al. Phenotyping primary human microglia: tight regulation of LPS responsiveness. **Glia**, v. 60, n. 10, p. 1506–1517, 2012.
- MERVYN, S. M. D. et al. The Third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **The Journal of the American Medical Association**, v.315, n.8, p.801-810, 2016.
- MESQUITA S.; FU Z.; KIPNIS J. The meningeal lymphatic system: a new player in neurophysiology. **Neuron**, v.2, n.100, p.375-388, 2018.
- MESTAS, J.; HUGHES, C.C.W. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 5, p. 2731 – 2738, 2004.
- MICHELS, M. et al. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. **Brain, behavior, and immunity**, v. 43, p. 54-59, 2015.
- MICHELS, M.; SONAI, B.; DAL-PIZZOL, F. Polarization of microglia and its role in bacterial sepsis. **Journal of neuroimmunology**, v. 303, p. 90-98, 2017.
- MICHELS, M. et al. Characterization and modulation of microglial phenotypes in an animal model of severe sepsis. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 24, n. 1, p. 88-97, 2020.
- MORAES, C.A. et al. Activated microglia-induced deficits in excitatory synapses through IL-1 $\beta$ : implications for cognitive impairment in sepsis. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 653-663, 2015.
- MOSTEL, Z. et al. Post-sepsis syndrome - an evolving entity that afflicts survivors of sepsis. **Molecular Medicine**, v. 26, n.6, 2019.
- MUKHERJEE, S.; KARMAKAR, S.; BABU, S.P.S. TLR-2 and TLR-4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. **The Brazilian Journal of Infectious diseases**, v. 20, n.2, 193-204, 2016.
- MUNOZ, C. et al. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. **The journal of clinical investigation**, v. 88, n. 5, p. 1747-1754, 1991.
- NAWROTH, P.P. et al. Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. **Proceedings of National Academy of Sciences of United State of America**, v.83, n. 10, p. 3460-3464, 1986.
- NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161-1169, 2010.

NEVADA, C.; MENASSA, J.; PUTHALAKATH, H. Sepsis: inflammation is a necessary evil. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 7, n. 108, 2019.

NIKAYIN, S. et al. Anxiety symptoms in survivors of critical illness: a systematic review and meta-analysis. **General Hospital Psychiatry**, v. 43, n. March 2015, p. 23–29, 2016.

ODA et al. Biossegurança em laboratórios de saúde pública. Ministério da Saúde, 1998.

OZCAN, P. E. et al. Effects of intravenous immunoglobulin therapy on behavior deficits and functions in sepsis model. **Annals of intensive care**, v. 5, n. 1, p. 62, 2015.

PAPADOPOULOS, M.C. et al. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 8, p. 3019-3024, 2000.

PARKER, A. M. et al. Post-traumatic stress disorder in critical illness survivors: A metaanalysis. **Critical Care Medicine**, v. 43, n. 5, p. 1121–1129, 2015.

PAVLOV, V. A. et al. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. **Proceedings of National Academy Science of United State of America**, v. 103, n. 13, p. 5219– 5223, 2006.

PAZINI, F. L. et al. Creatine prevents corticosterone-induced reduction in hippocampal proliferation and differentiation: possible implication for its antidepressant effect. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 8, p. 6545-6260.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PENA, G. et al. Cholinergic regulatory lymphocytes re-establish neuromodulation of innate immune responses in sepsis. **Journal of immunology**, v. 187, n. 2, p. 718-725, 2011.

PERCIE DU SERT, N. et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, v. 18, n. 7; e3000410, 2020.

PERRY, V. H.; NICOLL, J. A. R.; HOLMES, C. Microglia in neurodegenerative disease. **Nature Reviews. Neurology**, v. 6, n. 4, p. 193-201, 2010.

PERRY, V. H.; TEELING, J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. **Seminars in immunopathology**, v. 35, n. 5, p. 601– 612, 2013.

PFISTER, D. et al. Cerebral perfusion in sepsis-associated delirium. **Critical Care**, v. 12, n. 3, R63, 2008.

PIZZAGALLI, D. A. Depression, stress, and anhedonia: toward a synthesis and integrated model. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 10, p. 393-423, 2014.

- PLANCHEZ, B. et al. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of neural transmission**, v.126, n. 11, p.1383-1408, 2019.
- PLENGE, R. M.; SCOLNICK, E.M.; ALTSHULER, D. Validating therapeutic targets through human genetics. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 12, p. 581-594, 2013.
- POLI, A. et al. NK cells in central nervous system disorders. **Journal of Immunology**, v. 190, n. 11, p. 5355-5362, 2013.
- POULSEN, J. B. et al. Long-term physical outcome in patients with septic shock. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 53, n. 6, p. 724–730, 2009.
- PRAGER, G. et al. Amygdaloid signature of peripheral immune activation by bacterial lipopolysaccharide or staphylococcal enterotoxin B. **Journal of neuroimmune pharmacology**, v. 8, n. 1, p. 42-50, 2013.
- PRESCOTT, H. C. et al. Late mortality after sepsis: Propensity matched cohort study. **British Medical Journal**, v. 353, p. 1–8, 2016.
- PRESCOTT, H.C; ANGUS, D.C. Enhancing recovery from sepsis: a review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 319, n.1, p.62–75, 2018a.
- PRESCOTT, H. C.; ANGUS, D. C. Postsepsis morbidity. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 319, n. 1, p. 91, 2018b.
- PROBST, J. J. et al. Pulmonary and muscle profile in pneumosepsis: A temporal analysis of inflammatory markers. **Cytokine**, v. 114, p. 128-134, 2019.
- PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.
- QUINTANO NEIRA, R. A.; HAMACHER, D.; JAPIASSÚ, A. M. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. **PLoS One**, v. 13, n. 4, 2018.
- RABIEE, A. et al. Depressive Symptoms after Critical Illness: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Critical Care Medicine**, v. 44, n. 9, p. 1744–1753, 2016.
- RADU, M.; CHERNOFF, J. An in vivo Assay to Test Blood Vessel Permeability. **Journal of visualized experiments**, v. 16, n. 73, e50062, 2013.
- RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends in pharmacological science**, v. 29, n. 10, p. 493-498, 2008.
- RANKIN, C. H. et al. Habituation Revisited: An Updated and Revised Description of the Behavioral Characteristics of Habituation. **Neurobiology of learning and memory**, v. 92, n. 2, p. 135-138, 2009.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 119–145, 2009.

RANSOHOFF, R. M.; CARDONA, A. E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 253–262, 2010.

RANSOHOFF, R. M. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 987-991, 2016.

REINHART, K. et al. Recognizing sepsis as a global health priority – a WHO resolution. **New England Journal of Medicine**, v.377, n. 5, p. 414-417, 2017.

REN, C. et al. Sepsis-associated encephalopathy: a vicious cycle of immunosuppression. **Journal of neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 14, 2020.

REZOAGLI, E.; FUMAGALLI, R.; BELLANI, G. Definition and epidemiology of acute respiratory distress syndrome. **Annals of translation medicine**, v. 5, n. 14, p. 282, 2017.

RHEE, C. et al. Incidence and trends of sepsis in US hospitals using clinical vs claims data, 2009-2014. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 318, n. 13, p. 1241-1249, 2017.

RICHWINE, A.F. et al. Architectural changes to CA1 pyramidal neurons in adult and aged mice after peripheral immune. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, p. 1369-1377, 2008.

RIEL, D. VAN; VERDIJK, R.; KUIKEN, T. The olfactory nerve: A shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. **Journal of Pathology**, v. 235, n. 2, p. 277–287, 2015.

RITTIRSCH, D; HOESEL, L. M; WARD, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 137 – 143, 2007.

RUDD, K. E. et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the global burden of disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 200-211, 2020.

RUSSELL, J. A. et al. Changing pattern of organ dysfunction in early human sepsis is related to mortality. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 10, p. 3405–3411, 2000.

SAKR, Y. et al. Sepsis in Intensive Care Unit Patients: Worldwide data from the intensive care over nations audit. **Open Forum Infection Disease**, v.5, n.12, p.313, 2018.

SALES, J. H. R.; SOUZA, P.C; JAPIASSÚ, A. Sepse Brasil: estudo epidemiológico da sepse em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n.1, p. 9-17, 2006.

SAVI, F.F. et al. What animal models can tell us about long-term cognitive dysfunction following sepsis: A systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 124, p. 386-404, 2021.

SCHEIERMANN, C. et al. Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. **Immunity**, v. 37, n. 2, p. 290-301, 2012.

SCHMIDT, K. et al. Effect of a primary care management intervention on mental health-related quality of life among survivors of sepsis: a randomized clinical trial. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 24, p. 2703-2711, 2016.

SCHRAMM, P. et al. Impaired cerebrovascular autoregulation in patients with severe sepsis and sepsis-associated delirium. **Critical Care**, v. 16, n. 5, R181, 2012.

SCHULER, A. et al. The impact of acute organ dysfunction on long-term survival in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 46, n. 6, p. 843–849, 2018.

SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA; R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. **Mediators of inflammation**, v. 165974, 2013.

SEMMLER, A. et al. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 30, n. 2-3, p. 144–157, 2005.

SEMMLER, A. et al. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. **Experimental Neurology** v. 204, n. 2, p. 733-740, 2007.

SEMMLER, A. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v.84, n.1, p.62-69, 2013.

SEOK, J. et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 110, p. 3507 – 3512, 2013.

SEYMOUR, C. W. et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **The Journal of the American Medical Association**, v. 315, n.8, p. 762-774, 2016.

SFEIR, T. et al. Role of interleukin-10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 1, p. 129-133, 2001.

SHARSHAR, T.; BOZZA, F.; CHRÉTIEN, F. Neuropathological processes in sepsis. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 6, p. 534–536, 2014.



- SHAVER, C. M.; HAUSER, A. R. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. **Infection and immunity**, v. 72, n. 12, p. 6969-6977, 2004.
- SILVA, E. et al. Prevalência e desfechos clínicos de infecções em UTIs brasileiras: subanálise do estudo EPIC II. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.24, n.2, p.143-150, 2012.
- SINGER, B.H, et al. Cecal ligation and puncture results in long-term central nervous system myeloid inflammation. **PLoS One**, v.11, n.2, 2016.
- SINGH, D. et al. Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs). **Frontiers in molecular biosciences**, v.2, n. 19, p. 1-5, 2015.
- SOARES, A. C. et al. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 5, p. 1321-1329, 2006.
- SONNEVILLE, R. et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. **Annals of Intensive Care**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2013.
- SORDI, R. O. et al. Pneumonia-induced sepsis in mice: temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n.2, p. 144–155, 2013.
- STANKOVIC, N. D. et al. Microglia– blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. **Acta neuropathology**, v. 131, n. 3, p. 347-363, 2015.
- STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367-730, 1985.
- SUI, D. M. et al. Resveratrol protects against sepsis-associated encephalopathy and inhibits the NLRP3/IL-1beta Axis in microglia. **Mediators Inflammation**, p.1, 2016.
- SUMAR, A. H. S. et al. Aerobic exercise ameliorates survival, clinical score, lung inflammation, DNA and protein damage in septic mice. **Cytokine**, v. 140, 155401, 2021.
- TACCONE, F. S. et al. Sepsis is associated with altered cerebral microcirculation and tissue hypoxia in experimental peritonitis. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 2, p.114–122, 2014.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. and inflammation. **Cell**, n.140, p.805–820, 2010.
- TANG, D. et al. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. **Immunological Review**, v.249, n.1, p.158–175, 2012.
- TANRIOVER, M. D. et al. Epidemiology and outcome of sepsis in a tertiary-care hospital in a developing country. **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 2, p. 315–322, 2006.

- TEELING, J. L.; PERRY, V.H. Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 1062-1073, 2009.
- TINETTI, M. E.; NAIK, A. D; DADSON, J. A. Moving from disease-centered to patient goals-directed care for patients with multiple chronic conditions: patient value-based care. **JAMA Cardiology**, v. 1, n. 1, p. 9-10, 2016.
- TOWN, T.; NIKOLIC. V.; TAN, J. The microglial activation continuum: from innate to adaptive responses. **Journal of neuroinflammation**, v. 2, n. 24, 2005.
- TRACEY, K. J.; BEUTLER, B.; LOWRY, D. F. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science**, v. 234, n. 4775, p. 470 –474, 1986.
- TSAO, N. et al. Tumour necrosis factoralpha causes an increase in blood-brain barrier permeability during sepsis. **Journal of Medicine Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 812-812, 2001.
- TSURUTA, R.; ODA, Y. A clinical perspective of sepsis-associated delirium. **Journal of Intensive Care**, v.23, n.4, p.18, 2016.
- TUON, L. et al. Memory-enhancing treatments reverse the impairment of inhibitory avoidance retention in sepsis-surviving rats. **Critical Care**, v. 12, n. 5, 2008.
- VACHHARAJANI, V. et al. Obesity exacerbates sepsis-induced inflammation and microvascular dysfunction in mouse brain. **Microcirculation**, v. 12, n. 2, p. 183-194, 2005.
- VAN DER POLL, T. et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 7, p. 407–420, 2017.
- WADE, D. et al. Providing psychological support to people in intensive care: development and feasibility study of a nurse-led intervention to prevent acute stress and long-term morbidity. **BMJ Open**, v. 8, n. 7, e021083, 2018.
- WALSH, T.S. et al. Increased hospital-based physical rehabilitation and information provision after intensive care unit discharge: The RECOVER Randomized Clinical Trial. **JAMA internal medicine**, v. 175, n. 6, p. 901-910, 2015.
- WARREN, H. S. et al. Resilience to bacterial infection: difference between species could be due to proteins in serum. **The journal of infectious diseases**, v. 201, n. 2, p. 223 – 232, 2010.
- WEBERPALS, M. et al. NOS2 gene deficiency protects from sepsis-induced long-term cognitive deficits. **The journal of neuroscience**, v. 29, n. 45, p. 14177- 14184, 2009.
- WESTHOFF, D. et al. Systemic infection and microglia activation: a prospective postmortem study in sepsis patients. **Immunity Ageing**, v. 16, n. 18, 2019.
- World Health Organization. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide: a systemic review of the literature. **WHO**, 2011.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. **The journal of surgical research**, v. 29, n.2, p. 189-201, 1980.

WIDMANN, C.N; HENEKA, M.T. Long-term cerebral consequences of sepsis. **Lancet Neurology**, v.13, n.6, p.630–636, 2014.

WILHELMS, S. B. et al. Assessment of incidence of severe sepsis in Sweden using different ways of abstracting International Classification of Diseases codes: Difficulties with methods and interpretation of results. **Critical Care Medicine**, v. 38, n. 6, p. 1442–1449, 2010.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 83, n.1, p.1-16, 1984.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural – neurobiological concordance in effects of CNS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p, 90-110, 2005.

WILSON, J. X.; DRAGAN M. Sepsis inhibits recycling and glutamate-stimulated export of ascorbate by astrocytes. **Free radical biology & medicine**, v. 39, n. 8, p. 990-998, 2005.

WINTERS, B. D. et al. Long-term mortality and quality of life in sepsis: A systematic review. **Critical Care Medicine**, v. 38, n. 5, p. 1276–1283, 2010.

YAZDAN-ASHOORI, P. et al. Elevated plasma matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with severe sepsis. **Journal of critical care**, v. 26, n. 6, p. 556–565, 2011.

YENDE, S. et al. Inflammatory markers at hospital discharge predict subsequent mortality after pneumonia and sepsis. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v. 177, n.11, p. 1242-1247, 2008.

YENDE, S. et al. Long-term quality of life among survivors of severe sepsis: Analyses of two international trials. **Critical Care Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1461–1467, 2016.

ZAMPIERI, F. G. et al. The Epimed Monitor ICU Database®: A cloud-based national registry for adult intensive care unit patients in Brazil. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, n. 4, p. 418–426, 2017.

ZERHOUNI, E. A. US biomedical research: basic, translational, and clinical sciences. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 294, n. 11, p. 1352-1358, 2005.

ZHAO, Y. et al. Uncovering the mystery of opposite circadian rhythms between mouse and human leukocytes in humanized mice. **Blood**, v. 130, n. 18, p. 1995 – 2005, 2017.

ZHOU, H. et al. Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation. **Journal of Immunology**, v. 183, n.8, p. 5244-5250, 2009.

ZOLFAGHARI, P. S. et al. The metabolic phenotype of rodent sepsis: cause for concern?  
**Intensive care medicine experimental**, v. 25, n. 1, 2013.