UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Ana Letícia Júlio de Souza

**Sepse induz alteração em memória a longo prazo de camundongos jovens:
possível mecanismo neurogênico**

Ribeirão Preto

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Ana Letícia Júlio de Souza

**Sepse induz alteração em memória a longo prazo de camundongos jovens:
possível mecanismo neurogênico**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha.

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Aline Cristina de Campos

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por quaisquer meios convencionais ou eletrônicos, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Souza, Ana Letícia Júlio

Sepse induz alteração em memória a longo prazo de camundongos jovens: possível mecanismo neurogênico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Farmacologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Cunha, Fernando de Queiróz.

Co-orientador: Campos, Alline Cristina de.

Palavras-chave: sepsis, infante, memória de aprendizado, neurogênese, DCX..

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Letícia Júlio de Souza

Sepse induz alteração em memória a longo prazo de camundongos jovens: possível mecanismo neurogênico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em: __/__/

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha

FMRP/USP

Julgamento:_____

Assinatura:_____

Membro 1:_____

Instituição:_____

Julgamento:_____

Assinatura:_____

Membro 2:_____

Instituição:_____

Julgamento:_____

Assinatura:_____

Trabalho realizado no Laboratório de Dor e Inflamação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Mara e Joaquim, que sempre fizeram o possível e, às vezes, até o considerado impossível para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Além de me ensinarem a sonhar e ir atrás de realizar meus sonhos, também me ensinaram a ser forte, a ter garra e caráter.

Todas minhas conquistas são suas.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Fernando de Queiróz Cunha, pela acolhida em seu laboratório e pelas discussões científicas.

À professora Alline Cristina de Campos pela coorientação e por ter disponibilizado seu laboratório para realização de parte deste trabalho. Agradeço, ainda, ao Gabriel, por toda colaboração neste trabalho e, principalmente, pela amizade, você foi essencial para a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório: Kátia, Ieda, Diva, Marcela, Juliana, Serginho, Marquinhos, por todo suporte técnico, amizade e carinho.

À minha amiga Ana Laura, que mesmo a distância sempre está presente em minha vida, compartilhando desde os melhores momentos até os que não são tão agradáveis; amiga em quem sempre busco conforto e conselhos, que é força para sempre ser o meu melhor; minha irmã que a vida me deu, te amo.

A minha amiga Maria Cláudia, por quem tenho imenso carinho e gratidão. Desde a graduação podemos acompanhar o crescimento uma da outra, como pessoa e profissionalmente; pessoa em que em meio as minhas dúvidas e momentos difíceis impediu de eu desistir; pessoa que sempre me alegra com toda sua energia contagiante.

Aos amigos que pós-graduação me presenteou: Camila, Timna, Isaac, Beatriz, Nathália, Vanessa. Pessoas maravilhosas, com quem muito pude aprender sobre vida e ciência. Levarei para sempre nossa amizade.

Ao David Colón, grande cientista, que me ensinou boa parte das técnicas utilizadas no decorrer deste trabalho e, que tive oportunidade de fazer colaborações.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Inflamação e Dor e do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

À minha família, para qual dedico este trabalho, principalmente meus pais, por todo apoio e incentivo durante esta jornada.

Ao meu noivo Davi, meu suporte para finalizar esta jornada, me impedindo de desistir e provou quão capaz e merecedora eu sou. Obrigada por dividir sonhos comigo, por ser minha família e cuidar de mim. Com certeza não estaria escrevendo este trabalho se não fosse você. Também agradeço aos nossos meninos de quatro patas, Bóris, Dênis e Don.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a Deus pelas oportunidades e por ter me dado força nos momentos em que isto era a única alternativa que restava.

Resumo

RESUMO

SOUZA, ALJ. Sepsis induz alteração em memória a longo prazo de camundongos jovens: possível mecanismo neurogênico. 2020. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A sepsis é uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por respostas imunes desreguladas do organismo a um patógeno. No Brasil, a sepsis é uma das principais causas de internação e morte em unidades de terapia intensiva e encontra-se cada vez mais presente em pacientes pediátricos devido ao aumento da população de risco. A taxa de mortalidade em crianças com sepsis grave alcançou 50% nos últimos anos. Dados apontam que pelo menos 20% dos adultos sobreviventes à sepsis tem alguma alteração física, cognitiva ou de memória. No entanto, pouco se sabe sobre as alterações dessa síndrome inflamatória e suas consequências no desenvolvimento dos pacientes pediátricos após esta condição. Portanto, é importante investigar as alterações neuropsiquiátricas desenvolvidas durante a sepsis grave em infantes. Para isto, utilizamos o modelo experimental de indução de sepsis grave por inóculo i.p. de bactérias provenientes do ceco em camundongos infantes e adultos. Observamos que camundongos infantes são mais susceptíveis à sepsis quando comparado a camundongos adultos, apresentando maior mortalidade devido à disfunção orgânica, como já existente na literatura, validando, assim, nosso modelo experimental em infantes. Também observamos ruptura da barreira hematoencefálica no cérebro destes animais, como o aumento da produção de citocinas e quimiocinas no tecido e ativação de células da glia. Entretanto, não houve alteração no infiltrado de células inflamatórias. Após a sepsis, os animais infantes sobreviventes apresentaram déficit de memória de aprendizado. Análise imunohistológica das células progenitoras no hipocampo, mostrou que estas diminuem em quantidade no hipocampo de camundongos infantes sobreviventes. Assim, podemos concluir que sepsis grave em infantes desencadeia danos na memória por aprendizado, possivelmente pela diminuição da neurogênese hipocampal.

Palavras-chave: sepsis, sepsis neonatal, encefalopatia associada à sepsis, disfunção neuronal, memória, neurogênese hipocampal, neuroinflamação.

Abstract

ABSTRACT

SOUZA, ALJ. Sepsis induces alteration in long-term memory in young mice: possible neurogenic mechanism. 2020. 68 p. Dissertation (Master of Sciences in Pharmacology) – Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2020.

Sepsis is a potentially fatal organ disorder caused by the body's unregulated immune responses to a pathogen. In Brazil, sepsis is a major cause of hospitalization and death in intensive care units and is increasingly present in pediatric patients due to the increase in the risk population. The mortality rate in children with severe sepsis has reached 50% in recent years. Data indicate that at least 20% of adults surviving sepsis have some physical, cognitive or memory impairment. However, little is known about the changes in this inflammatory syndrome and its consequences on the development of pediatric patients after this condition. Therefore, it is important to investigate the neuropsychiatric disorders developed during severe sepsis in infants. For this, we used the experimental model of severe sepsis induction by i.p. of bacteria from the caecum in infant and adult mice. We observed that infant mice are more susceptible to sepsis when compared to adult mice, presenting higher mortality due to organ dysfunction, as already existing in the literature, thus validating our experimental model in infants. We also observed a rupture of the blood-brain barrier in the brain of these animals, such as increased production of cytokines and chemokines in the tissue and activation of glial cells. However, there was no change in the infiltration of inflammatory cells. After sepsis, the surviving infant animals showed a learning memory deficit. Immunohistological analysis of progenitor cells in the hippocampus, showed that they decrease in quantity in the hippocampus of surviving infant mice. Thus, we can conclude that severe sepsis in infants triggers memory damage through learning, possibly due to the decrease in hippocampal neurogenesis.

Keywords: sepsis, neonatal sepsis, sepsis-associated encephalopathy, neuronal dysfunction, memory, hippocampal neurogenesis, neuroinflammation.

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Sepses.....	16
1.2. Sepses pediátrica.....	18
1.3. Fisiopatologia da Sepses.....	19
1.4. Encefalopatia associada à sepses.....	23
1.5. Memória.....	24
1.6. Neurogênese hipocampal.....	27
1.7. Hipótese.....	30
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo geral.....	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1. Animais.....	34
3.2. Obtenção de bactérias.....	34
3.3. Indução da sepses.....	35
3.4. Bacteremia pós-sepses.....	35
3.5. Determinação da concentração sérica de Transaminase Glutâmica Oxalacética.....	35
3.6. Avaliação da integridade da Barreira Hematoencefálica.....	36
3.7. Determinação da concentração de citocinas.....	36
3.8. Perfusão intracardiaca e preparação de cortes histológicos.....	36
3.9. Imunofluorescência Indireta.....	37
3.10. Teste de reconhecimento de objetos.....	37
3.11. Imunohistoquímica para DCX.....	37
3.12. Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Padronização do modelo experimental de sepses por inoculação de bactérias em camundongos infantis.....	40

4.2. Caracterização da fase aguda de camundongos C57BL/6 infantes e adultos submetidos à sepse e validação de modelo experimental em infantes.....	41
4.3. Sepse causa aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, produção de citocinas no encéfalo com ativação de células da glia.....	43
4.4. Camundongos infantes sobreviventes a sepse apresentam déficit de aprendizagem a longo prazo.....	46
4.5. Camundongos infantes sobreviventes a sepse apresentam redução de neurogênese hipocampal.....	47
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS.....	57

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sepses

Desde a Grécia antiga observam-se relatos e descrições de sepses como um estado de putrefação e associação com doença e morte, tal qual como a observação feita por Hipócrates (460-377 a.C.): “quando a febre contínua, a superfície externa do corpo esta fria e existe internamente uma grande sensação de calor e sede, a afecção é mortal” (Manjo, G., 1991). Até os dias atuais, três conferências para consenso de sepses foram realizadas.

Em 1991 foi realizada a primeira conferência de consenso pela American College of Chest Physicians (ACCP) na Society of Critical Care Medicine (SCCM), estabelecendo que a sepses é uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), podendo ocorrer em pacientes com infecção, caracterizada por dois ou mais critérios de SIRS, como taquipneia, taquicardia, hipertermia ou hipotermia, leucocitose ou leucopenia e número de neutrófilos imaturos no sangue mais que 10% do total de leucócitos. Também foram definidos os termos sepses grave e choque séptico, sendo o primeiro para os casos em que é observada a disfunção orgânica e, o segundo, em casos em que ocorre uma hipotensão persistente associada à sepses (Bone et al., 1992).

O segundo consenso foi realizado em 2001 por iniciativa da SCCM, que reconheceu a importância de uma atualização. Além da SCCM, participaram a European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), ACCP, American Thoracic Society (ATS) e Surgical Infection Society (SIS). Nesta conferência foi estabelecido que os critérios de SIRS e sepses continuavam aplicáveis à clínica, entretanto, os critérios de SIRS passaram a ser considerados não específicos para diagnóstico de sepses. Foram adicionados novos parâmetros, como biomarcadores laboratoriais e observações clínicas, e também houve o desenvolvimento de um esquema de classificação denominado PIRSO: P – predisposição; I – natureza e extensão do insulto; R – magnitude da resposta do hospedeiro; O – grau de disfunção orgânica (Levy et al, 2003).

Importantes avanços na compreensão da fisiopatologia da sepses foram obtidos nos últimos anos. Fatores relacionados à heterogeneidade individual também acrescentaram complexidade à sepses. Assim, a ACCP e ESICM,

juntamente com a participação de 19 especialistas em modalidades pertinentes, iniciaram em 2014 uma força tarefa para revisar, novamente, as abordagens conceituais (Singer et al, 2016). Atualmente, resultado desta terceira conferência de consenso realizada em 2016, a sepse passou a ser definida como uma ameaça à vida associada à disfunção orgânica causada pela resposta desregulada do hospedeiro à uma infecção. Estima-se que 35% dos casos de sepse tem a infecção confirmada por teste microbiológico, assim, para fins diagnósticos e, também, como um meio de acelerar o início de tratamento do paciente, a pontuação obtida durante a avaliação da falência orgânica sequencial (SOFA - do inglês *sequential organ failure assessment*) quando maior ou igual a 2, juntamente com a suspeita de infecção, já caracteriza a sepse (Seymour et al., 2016). Também foi criado o qSOFA (do inglês *quick SOFA*), possibilitando a identificação rápida de quadros potenciais de falência de órgãos e mau prognóstico típicos de sepse, apenas por observação clínica, durante o contato primário como profissional de saúde responsável pela triagem do paciente com suspeita de infecção (Singer et al, 2016; Seymour et al., 2016). Outra alteração foi a definição de choque séptico, passando a ser definido como sepse associada às anormalidades circulatórias e metabólicas, que requer terapia vasopressora para manter a pressão arterial média acima de 60mmHg, ou aumento de níveis plasmáticos de lactato (maior que 2 mmol/L) na ausência de hipovolemia (Singer et al, 2016; Casserly et al., 2015; Shankar et al., 2016).

Um estudo realizado pela *Intensive Care Over Nations* (ICON) forneceu informações epidemiológicas de 10.069 pacientes em unidade de terapia intensiva (UTI) de Europa, Ásia e Américas, confirmando que 2.973 (29,5%) dos pacientes apresentavam sepse na admissão ou durante a internação na UTI. Nos pacientes com sepse, a mortalidade na UTI foi de 25,8% e a mortalidade hospitalar 35,3%, uma taxa de mortalidade significativamente maior do que em população geral da UTI (mortalidade na UTI, 16,2%; hospital mortalidade, 24,2%) (Vincent et al., 2014). Dados epidemiológicos demonstram que nos Estados Unidos a incidência passou de 359 para 535 casos de sepse a cada 100.000 habitantes (WALKEY et. al., 2015).

No Brasil, pesquisadores da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e do Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) relatam que a cada ano morrem mais de 230 mil pacientes adultos nas unidades de terapia intensiva (UTI), sendo atualmente, a condição que mais conduz ao óbito (MACHADO, F. R. et al., 2017). Uma análise retrospectiva realizada por Taniguchi e colaboradores (2014) sugere

que o número de óbitos no Brasil por sepse aumentou de 96 para 187 a cada 100.000 habitantes, dentre os anos 2002 e 2010. Além disso, o custo médio por hospitalização de cada paciente com sepse foi de R\$ 38.867,60 no ano de 2014, sendo que cerca de 59% dos gastos totais são investidos em pacientes que progridem para a morte (Barreto et al, 2016).

Fatores relacionados à heterogeneidade individual também acrescentam complexidade à sepse, como idade, comorbidades, lesão, uso de medicamentos e foco primário de infecção. Um estudo realizado na Nova Zelândia demonstrou que 1 a cada 8 pacientes admitidos nas UTIs com infecção, apresentavam falência orgânica, sem os requisitos mínimos de 2 dos critérios de SIRS, com morbidade e mortalidade significativas (Kaunonen et al, 2015). Isto não só justifica a atual revisão conceitual, como também reforça a ideia de que revisões periódicas são requeridas, um exemplo disso encontra-se na sepse pediátrica. As três conferências de consenso foram construídas através de características de pacientes adultos, contudo, registros epidemiológicos indicam que a sepse evolui de forma bastante distinta durante a infância (Kissoon et al., 2011).

1.2. Sepse pediátrica

Em 2005 foi realizada a Conferência Internacional de Consenso de Sepse Pediátrica, em que foram convocados 20 especialistas em sepse e pesquisa clínica de cinco países (Canadá, França, Holanda, Reino Unido e Estados Unidos), com o objetivo de modificar as definições de consenso publicadas para adultos. Assim, a sepse pediátrica é definida como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) na presença de infecção, sendo esta comprovada ou não (GOLDSTEIN, B. et al., 2005). Foram propostas seis faixas etárias clinicamente e fisiologicamente significativas para sinal vital específico da idade e variáveis laboratoriais para atender aos critérios SIRS, assim como para tratamento específico para a idade e desenvolvimento de alterações fisiológicas cardiorespiratórias: recém-nascido (0 a 7 dias), neonato (1 semana a 1 mês), lactente (1 mês a 1 ano), pré-escolar (2 a 5 anos), criança em idade escolar (6 a 12 anos), adolescente (13 a <18 anos). Os prematuros não foram incluídos, pois seus cuidados ocorrem principalmente em unidades de terapia intensiva neonatal (GOLDSTEIN, B. et al., 2005). As definições de sepse grave e choque séptico também sofreram readequação, sendo sepse

grave a sepse e desenvolvimento de disfunção de órgão cardiovascular OU síndrome do desconforto respiratório agudo OU dois ou órgãos apresentando disfunções, e Choque séptico como sepse e disfunção de órgãos cardiovasculares (GOLDSTEIN, B. et al., 2005).

Durante os últimos anos, a incidência de sepse pediátrica tem aumentado devido a vários fatores, os mais comuns são: o aumento do nascimento de prematuros e melhora na sobrevida de crianças com doenças graves (GONIN, M. L. C., 2012). Estudo aponta que, em 2010, 7,6 milhões de crianças no mundo com menos de 5 anos, incluindo neonatos, morreram por doenças infecciosas, incluindo sepse (WYNN, J. L., 2016). Globalmente, estima-se 22 casos de sepse na infância por 100.000 pessoas-ano, e 2202 casos de sepse neonatal por 100.000 nascidos vivos, traduzindo-se em 1,2 milhão de casos de sepse na infância por ano (Fleischmann-Struzek, et al., 2018). A mortalidade de crianças com sepse varia de 4% até 50%, dependendo da gravidade da doença, fatores de risco e localização geográfica (Balamuth, et al., 2014). A maioria das crianças que morrem de sepse sofre de choque refratário e / ou síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, com muitas mortes ocorridas nas 48-72 horas iniciais do tratamento (Weiss, et al., 2020). Assim, a identificação precoce, ressuscitação e gerenciamento apropriado são, portanto, pontos críticos para otimizar resultados de sobrevida em crianças com sepse.

As diferenças entre a sepse pediátrica e adulta vão além de critérios determinantes na sua classificação. Estudos do nosso grupo demonstraram que pacientes adultos sobreviventes à sepse desenvolvem imunossupressão, o que não é observado em pacientes sobreviventes à sepse pediátrica (Cólon, et al. 2020).

1.3. Fisiopatologia da sepse

O sistema imune inato é o responsável por iniciar a resposta inflamatória através de reconhecimento de constituintes dos microorganismos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), como também de sinais endógenos de dano (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*). Esses padrões moleculares associam-se aos receptores específicos (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) nas células (Figura 1). Com a ativação dos PRRs, iniciam-se cascatas de sinalização intracelulares que levam à ativação de fatores de

transcrição, tais como o fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated Bcells*), proteína ativadora 1 (AP-1, do inglês *activator protein 1*) e o fator regulador do interferon (IRF, do inglês *interferon regulatory factor*). Assim, há a indução da transcrição de inúmeros genes inflamatórios e, conseqüentemente, produção de mediadores, como células quimioatraentes, o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumoral necrosis factor*), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de ativação plaquetária (PAF, do inglês *platelet-activating factor*), óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) através da isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS, do inglês *inducible NO synthase*), entre outros (HOTCHKISS, et al., 2017).

Dentre os eventos iniciais desencadeados pela resposta inflamatória resultante da interação entre células residentes e o componente infeccioso, estão aqueles que culminam no recrutamento de neutrófilos para o local de infecção. Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares originários da medula óssea, que são capazes de fagocitar microrganismos e, através do conteúdo dos seus grânulos citoplasmáticos e da produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI, do inglês *reactive oxygen intermediates*), destruir os mesmos (BORREGAARD, 2010). A passagem dos neutrófilos da corrente sanguínea para o foco infeccioso ocorre nas vênulas pós capilares, processo resultante através da ação de mediadores inflamatórios liberados por células residentes, como as quimiocinas, que se difundem e possibilitam mudanças moleculares nos vasos e neutrófilos, permitindo que esta etapa seja concluída (ALVES-FILHO, et al, 2008). Nos modelos de estudo de sepse, tem sido demonstrado que a migração dos neutrófilos varia de acordo com a extensão do inóculo microbiano no local primário: estímulos menos extensos geram adequada migração destas células para o foco infeccioso, com conseqüente controle da infecção e sobrevivência dos animais; já a exposição dos animais a inóculos mais extensos resulta na falha de migração dos neutrófilos, levando à disseminação bacteriana para a corrente sanguínea e morte (BENJAMIM, et al., 2000; CROSARA-ALBERTO, et al., 2002; ALVES-FILHO, et al., 2005; RIOS-SANTOS, et al., 2007; ALVES-FILHO et al, 2008). O mesmo foi observado em pacientes com sepse, sendo que a redução quimiotática de neutrófilos mais pronunciada ocorreu em pacientes que não sobreviveram ao quadro (TAVARES-MURTA, et al., 2002).

Um dos mecanismos propostos para a falência de migração de neutrófilos durante a sepse é a ativação excessiva de receptores do tipo toll (TLRs, do inglês *toll like receptors*), que é mostrada por nosso grupo, onde animais deficientes de TLR2, TLR4 e TLR9 são menos suscetíveis à sepse polimicrobiana em decorrência do adequado recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso (ALVES-FILHO, et al., 2006; ALVES-FILHO, et al., 2009; TREVELIN, et al., 2012). Além disso, a exacerbação na produção sistêmica de NO e quimiocinas, como CXCL1 e CXCL2, também prejudicam o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção (RIOS-SANTOS, et al., 2007). Isso ocorre devido redução na expressão do receptor quimiotático CXCR2 na superfície dos neutrófilos circulantes, em parte, através da fosforilação pela quinase dos receptores acoplados à proteína G2 (GRK2, do inglês *G protein-coupled receptor kinase 2*) (RIOS-SANTOS, et al., 2007; ALVES-FILHO, et al., 2010; ARRAES, et al. 2007). Já o NO causa a redução na expressão de moléculas de adesão endotelial, prejudicando a adesão e posterior transmigração de neutrófilos para o local de infecção (RIOS-SANTOS, et al., 2007; TORRES-DUEÑAS, et al., 2006).

Outra função efetora dos neutrófilos recentemente relatada são as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*), que também está envolvida no controle de infecções (Brinkmann, et al., 2004). NETs são uma matriz de DNA extracelular, também contendo proteínas granulares e histonas, liberadas pelos neutrófilos para degradar fatores de virulência e matar bactérias, no entanto, existem evidências de que as NETs também foram implicadas na patogênese da disfunção orgânica (Brinkmann, et al., 2004; COLÓN, et al., 2019). Trabalho realizado por nosso grupo utilizando modelo de sepse polimicrobiana e endotoxemia (LPS) mostrou que, comparado ao produzido por camundongos sépticos adultos, neutrófilos de camundongos sépticos infantis produziram concentrações significativamente maiores de NETs e, além disso, a degradação de NETs pela Desoxirribonuclease humana recombinante (rhDNase, do inglês *recombinant human deoxyribonuclease*) ou do inibidor da enzima peptidilarginina desiminase-4 (PAD-4 inibidor, do inglês *peptidylarginine enzyme deiminase-4 inhibitor*) *in vivo* aumentou acentuadamente a taxa de sobrevivência de sepse infantil grave em camundongos, sugerindo que o aumento da produção NET

também está associado ao indicador clínico de gravidade da sepse pediátrica (COLÓN, et al., 2019)

Figura 1: Receptores celulares que reconhecem constituintes microbianos e sinais endógenos de dano. A ilustração expõe alguns padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou ao dano (DAMPs) e seus principais receptores de reconhecimento padrão (PRRs). PAMPs e DAMPs são, geralmente, glicoproteínas, lipoproteínas, ou ácidos nucleicos. Os PRRs podem ser encontrados na membrana plasmática ou no compartimento intracelular, na forma de monômeros, homodímeros ou heterodímeros. Uma vez ativados, as vias de sinalização que se seguem, geralmente, convergem para a sinalização do fator regulador de interferon (IRF), fator nuclear- KB (NF- KB) ou proteína ativadora 1 (AP-1). Enquanto o IRF induz a produção de interferon tipo I (IFN), o NF- KB e AP-1 induzem a transcrição de diversos genes inflamatórios. Adaptado de HOTCHKISS, et al., 2017.

A ativação exacerbada e desregulada do sistema imune durante a sepse leva a produção e secreção de altas concentrações de mediadores pró-inflamatórios, tornando-se responsável pela maioria das alterações fisiopatológicas tais como, lesões teciduais e disfunção de órgãos, dentre eles, o sistema nervoso central (SNC) (ALVES-FILHO, J. C. *et al.*, 2008; DE MONTMOLLIN, E. and ANNANE, D., 2011; Sharshar et al., 2004). No cérebro, as citocinas podem ser liberadas a partir de células imunes ativadas, como micróglia ou macrófagos ativados, e desempenham

um papel crucial na patogênese da lesão no sistema nervoso central (SNC), uma vez que há interação com células da glia e células endoteliais, prejudicando, assim, a estabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), o metabolismo neuronal e neurotransmissão, contribuindo para o desenvolvimento da encefalopatia associada à sepse (EAS) (PAN, W. et al, 2011; Sharshar et al., 2004).

1.4. Encefalopatia Associada à Sepse

A encefalopatia associada à sepse (EAS) é uma doença caracterizada como o estado mental alterado, pensamento desorganizado, desatenção e comprometimento da memorização e funções executivas, podendo variar de delírio a coma em pacientes com sepse (HEMING, N. et al. 2017). Inicialmente, pensava-se na EAS como um evento reversível, no entanto, recente estudo realizado por Iwashyna e colaboradores (2010) detectou comprometimento cognitivo em sobreviventes com sepse grave mesmo 3 anos após a alta hospitalar, o que está associado, também, ao aumento da morbimortalidade (Widmann e Heneka, 2014). A EAS ocorre em cerca de um terço dos pacientes sépticos (Pytel e Alexander, 2009), sendo, portanto, um fator de risco tanto para o desenvolvimento de disfunção cognitiva a longo-prazo como para a mortalidade (PANDHARIPANDE, P. P. et al, 2013).

Sabe-se que a EAS é uma disfunção cerebral induzida por inflamação periférica, entretanto sua patogênese permanece incerta. Análises post-mortem de pacientes com sepse detectaram hemorragia óbvia, síndrome de hipercoagulabilidade, microacessões, leucoencefalopatia necrosante multifocal, isquemia e neuroinflamação (Sharshar et al., 2004). Uma análise temporal da patogênese da EAS em modelo de sepse animal demonstrou que a inflamação periférica ativa a microglia, aumenta os níveis de fatores inflamatórios, danifica a barreira hematoencefálica e desregula o metabolismo cerebral (Yokoo et al., 2012; Sonnevile et al., 2013; Singer et al., 2016; Heming et al., 2017). É importante mencionar que na literatura pouco se é sabido sobre a fisiopatologia de EAS na sepse pediátrica.

De acordo com a *Global Sepsis Alliance*, pelo menos 20% dos sobreviventes à sepse tem alguma forma de sequela física ou cognitiva (IWASHYNA, T. J. et al., 2010). A literatura tem sugerido alterações cognitivas em indivíduos adultos

sobreviventes à sepse, sendo elas: falta de atenção, deficiência na fluência verbal e função executiva, memória verbal alterada e falha de processamento visual (SEMMLER, *et. al.*, 2013; GÖTZ, *et. al.*, 2017). Esses déficits têm gerado interesse substancial, pois indivíduos afetados podem exigir reabilitação ou cuidado domiciliar. Semmler e colaboradores descobriram que sobreviventes à sepse, além de déficits na aprendizagem verbal, como descrito anteriormente, também apresentaram déficit de memória e redução de volume hipocampal de 6 até 24 meses após a alta hospitalar (Semmler et al., 2013). Isso sugere que a EAS pode levar a persistente comprometimento das funções cerebrais. Além disso, Schuler et al. a disfunção neurológica aguda relacionada à sepse foi a disfunção orgânica mais fortemente associado à mortalidade a curto e longo prazo, como também foi um mediador crítico dos resultados adversos a longo prazo após a sepse (Schuler et al., 2018).

É importante ressaltar que, como relatado, o comprometimento da memória é o déficit cognitivo à longo prazo mais comum observado em pacientes adultos após a sepse após a alta hospitalar (IWASHYNA, T. J. et al., 2010). Este déficit de memória também é relatado em modelo animal (TUON, L. et al., 2008). Entretanto, na sepse pediátrica pouco se sabe sobre o comprometimento cognitivo à longo prazo. Portanto, é importante investigar as alterações neurológicas e cognitivas, em especial a memória, decorrentes de sepse na pediatria.

1.5. Memória

Memória é a habilidade dos seres vivos de adquirir, reter e utilizar informações, sendo dependente da capacidade do sistema nervoso de modificar-se frente a experiências (HELENE & XAVIER, 2007). O processo de formação da memória é subdividido em nas seguintes etapas: aquisição, consolidação e evocação. A aquisição ou aprendizado corresponde ao momento em que informações são detectadas pelos sistemas sensoriais, ou seja, a exposição à experiência, onde ocorre uma seleção das informações que são mais significantes (LENT, 2010). A consolidação das informações adquiridas é o passo seguinte na formação da memória, após um período de tempo variável (minutos ou horas) posterior ao contato com o estímulo/experiência a ser memorizado, as informações recém-adquiridas tornam-se estáveis por meio de uma série de processos que envolvem síntese proteica e modificações sinápticas, resultando na consolidação. Essa é uma

fase instável e sujeita a modulações (IZQUIERDO, 2002; SQUIRE & KANDEL, 2003). A evocação corresponde ao momento em que as informações aprendidas podem ser recuperadas e utilizadas (SARA, 2000; MONFILS e col., 2009; HERRY e col., 2010).

Tratando-se dos aspectos neurobiológicos da memória, muitos pesquisadores tentaram localizá-la a nível cerebral. Em 1938, o neurocirurgião canadense Wilder Penfield concluiu que a memória poderia estar relacionada com o lobo temporal, através da tentativa de mapear as microrregiões encefálicas de um paciente com epilepsia, onde realizava estimulações elétricas em diversas áreas cerebrais, e observou que em raras ocasiões, devido a estimulação de porções do lobo temporal, o paciente relatava experiências já vividas que podiam ser amplamente descritas (PENFIELD & PEROT, 1963). Contudo, foi o estudo publicado em 1957 que possibilitou elencar definitivamente o lobo temporal com a memória, tornando-se um marco para a neurociência. O estudo traz o relato de um paciente com epilepsia, Henry Molaison (H.M), que passou por uma lobotomia para a retirada dos lobos temporais, que continham o foco para suas crises, o que trouxe alívio para suas constantes convulsões, porém o levou a um profundo déficit de memória, passando a apresentar amnésia anterógrada desde o dia da cirurgia e sendo, a partir dela, incapaz de formar novas memórias de fatos ou eventos (SCOVILLE & MILNER, 1957). Ao realizar o acompanhamento temporário do paciente H.M. após a cirurgia, os pesquisadores observaram que H.M. apresentava uma crescente melhora em sua habilidade motora quando colocado para realizar tarefas complicadas (como desenhar figuras específicas em frente a um espelho) mesmo que nunca as tivesse feito em sua vida antes da cirurgia, reforçando a ideia de existirem divisões sistemáticas em relação a memória (CORKIN, 1965).

Ainda sobre o paciente H.M, seu caso também promoveu valiosos achados sobre o tempo de armazenamento das informações memorizadas, bem como o local onde estas podem ser estocadas. Em suas observações, Milner constatou que H.M ainda mantinha boa fluência do inglês e conseguia descrever fatos passados e até mesmo de minutos antes de sua cirurgia com precisão e fluidez (SCOVILLE & MILNER, 1957; CORKIN, 1965). Além do mais, H.M era capaz de replicar uma informação dada a ele segundos ou minutos depois e progredir em uma conversação momentânea normalmente, apesar de não ser capaz de se lembrar dela no dia posterior (SCOVILLE & MILNER, 1957; CORKIN, 1965). Essas

informações validaram outra forma de divisão da memória, relacionado ao tempo de armazenamento da informação, que consiste em memórias de curto prazo que duram de minutos a poucas horas, e memórias de longo prazo, com duração indefinida, podendo durar até o fim da vida. Uma memória de curto prazo pode vir a ser uma memória de longo prazo dependendo da reverberação dessa informação, da atenção dada a ela e de aspectos emocionais ligados ao fato, dentre outras coisas (SCOMPARIN, 2020).

Se tratando do processo de consolidação da memória, sabe-se hoje que o hipocampo, localizado no lobo temporal, é um dos componentes mais importantes a nível estrutural (EICHENBAUM, 2004; OPITZ, 2014; VOSS et al., 2017). Sua composição estrutural permite a integração de informações adquiridas de diversos sistemas cerebrais: este *input* alcança o giro denteado através da via perforante e, posteriormente, atinge o corno de Ammon 3 (CA3) pelas fibras musgosas (Mossy); a região CA3 se conecta com o corno de Ammon 1 (CA1) pelos colaterais de Schaffer, a qual emite projeções para o subículo, importante via de saída hipocampal e que caracteriza o fim de um circuito importante para a reverberação da informação adquirida (Figura 2) (KESNER, 2007; ZHAO et al., 2006). O processo mecânico de consolidação da memória teve seus primeiros “achados” em 1973 pelos pesquisadores Timothy Bliss e Terje Lomo, que observaram uma mudança na eletrofisiologia de neurônios hipocampais após a administração de pulsos de alta frequência, o que contribuiu para o aumento da força sináptica na região, evento este que foi denominado de potenciação a longo prazo (LTP – do inglês *long term potentiation*) (BLISS & LØMO, 1973). A fase tardia da LTP, após um crítico período de estimulação de alta frequência, é caracterizada pela síntese proteica de moléculas chave para sua manutenção, o que explica o tempo levado para uma memória de curto prazo se tornar uma memória de longo prazo, como também pode explicar sua maior durabilidade (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; KANDEL, 2001).

Figura 2: Arquitetura geral da formação hipocampal. A principal via aferente vem da zona entorrinal, cursa ao longo do sulco hipocampal obliterado, contornando o giro denteado. Quando passam sob o giro denteado (círculos azuis), axônios aferentes fazem sinapse com dendritos de neurônios granulosos. Axônios destes (fibras musgosas) fazem sinapse nos neurônios de CA3 (elipses amarelas). Axônios de CA3 bifurcam, parte entrando no alveus e fímbria. Colaterais destes se dirigem a CA1, onde fazem sinapse nos dendritos dos neurônios piramidais (triângulos vermelhos). Axônios dos neurônios piramidais de CA1 também bifurcam - parte entram no alveus, parte tomam direção oposta para fazer sinapse em neurônios piramidais do subículo (triângulos verdes). Axônios subiculares dirigem-se ao alveus para sair do hipocampo através da fímbria. A via perfurante (A') origina-se de colaterais da via aferente principal que 'perfura' o subículo e cujos axônios fazem contato sináptico diretamente nos dendritos apicais de CA1.

1.6. Neurogênese hipocampal

O termo Neuroplasticidade refere-se à capacidade do sistema nervoso de mudar, adaptar-se e moldar-se a nível estrutural e funcional ao longo do desenvolvimento neuronal e quando sujeito a novas experiências. Dentre os tipos de neuroplasticidade, esta a neurogênese. Neurogênese é definida como processo de formação de novos neurônios no cérebro, provenientes de células-tronco neurais e progenitores neurais. A descoberta da neurogênese pós-natal por Altman e Das em 1960 veio contrariar o dogma de que os neurônios com que nascemos são os únicos que sempre teremos, que até esta data pensava-se ser verdade (TODA & GAGE, 2017).

O pesquisador Joseph Altman, usando autorradiografia com [3-H] –timidina, relatou evidências de neurônios recém-nascidos em ratos e gatos adultos cérebros (ALTMAN 1962,1963; ALTMAN E DAS 1965,1966). Após três décadas de debate, várias novas tecnologias, incluindo o uso de análogo sintético de timidina 5-bromo-2'-desoxiuridina, bem como imunomarcção multicor, com marcadores específicos e microscopia confocal com cálculo estereológico de células imunomarcadas foram desenvolvidos, o que ajudou a confirmar a existência de neurogênese adulta (ECKENHOFF & RAKIC 1988; KAPLAN 1985; RAKIC 1985). Eventualmente, a neurogênese pós-natal foi confirmada no giro denteado (DG) do hipocampo de roedores (KEMPERMANN et al. 1997B; KUHN et al. 1996; SEKI & ARAI, 1999), como também vários estudos revelaram que este processo é altamente regulado pela experiência, bem como por fatores ambientais e biológicos como a inflamação (TODA & GAGE, 2017; DE MIRANDA et al, 2017).

Assim, iniciaram investigações sobre a morfologia destas células no GD envolvidas na neurogênese pós-natal. As células-tronco neurais (tipo 1 RGLs – do inglês *radial glia-like cells*) são encontradas na área estreita entre a camada de células granulares e o hilo, denominada zona subgranular (SGZ). Duas características essenciais das células-tronco neurais são auto-renovação e multipotência para gerar células neurais específicas (BONAGUIDI et al. 2011). As RGLs geram progenitores de amplificação transitória tipo 2 (células do tipo 2a e 2b), que dão origem a neuroblastos (tipo 3), que ainda são capazes de proliferar e se diferenciar em neurônios (Figura 3) (BONAGUIDI et al, 2012; LUGERT et al., 2010; SUH et al., 2007). Além de neurônios, as RGLs no SGZ dão origem a uma pequena população de células gliais, como astrócitos (ENCINAS et al. 2011; VAN PRAAG et al. 1999). Uma série de fatores extrínsecos e intrínsecos regulam a neurogênese em vários estágios de desenvolvimento, incluindo fatores de crescimento e seus receptores, hormônios, neurotransmissores, moléculas de adesão celular, fatores citoplasmáticos, fatores de transcrição e modificadores epigenéticos (TODA & GAGE, 2017).

Figura 3: Diferenciação no SZG. Células tronco neurais tipo 1 (RGLs) e suas diferenciações na SZG do GD, com fatores de transcrição e marcadores específicos de cada tipo celular. (Adaptado de TODA & GAGE, 2017).

Uma das características intrigantes e fundamentais da neurogênese pós-natal é que este processo também é regulado pelo comportamento, experiência e / ou emocional de um indivíduo. Estudos com modelo animal em que é realizado um enriquecimento ambiental mostraram que houve indução de mudanças funcionais no cérebro, levando a um aumento significativo do número de células recém-nascidas e o aumento de volume da SGZ, além de melhora na velocidade de aprendizagem espacial (KEMPERMANN et al. 1997). Em contraste, o estresse e o envelhecimento diminuem o número de neurônios nascidos em adultos no GD por meio da sinalização de corticosteroides (CAMERON E MCKAY 1999; GOULD et al. 1997; KUHN et al. 1996). A partir destes exemplos, podemos observar que a taxa de neurogênese pós-natal e/ou a integração de neurônios recém-nascidos pode ser

regulada por fatores ambientais e biológicos em uma direção positiva e negativa, e suas consequências podem afetar a função cerebral.

1.7. Hipótese

Uma vez que a taxa de neurogênese pós-natal é regulada, este estudo tem como hipótese de que a sepse durante a infância atua como um regulador negativo da neurogênese hipocampal, afetando a plasticidade e, conseqüentemente, a memória.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar as alterações neuropsiquiátricas induzidas pela sepse grave em animais infantis

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Estabelecer um modelo de sepse letal intraperitoneal (i.p.) em camundongos infantis (2 semanas de vida).

2.2.2. Avaliar as alterações cognitivas de camundongos infantis posteriormente à sepse grave.

2.2.3. Investigar as alterações bioquímicas e estruturais no SNC de camundongos infantis durante e após a sepse grave.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57/BL6 de duas e seis semanas de idade. Todos os animais foram obtidos no Biotério Central do campus da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto, e mantidos ao longo do experimento no biotério de Experimentação do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, em condições de temperatura de 23-25°C, ciclo de claro/escuro de 12 horas, com acesso livre a água e ração.

3.2. Obtenção de bactérias

Foi feita a remoção cirúrgica por laparotomia do ceco de um camundongo adulto C57BL/6, do qual foi retirado o conteúdo, que, posteriormente, foi filtrado com uma gaze estéril e cultivado em meio com infusão de coração e cérebro (BHI – do inglês *Brain and heart infusion broth*; Difco Laboratories, Detroit, MI) durante cinco dias, a 37°C. O meio de cultivo das bactérias foi trocado a cada 24 horas através de centrifugação (3000 g, 15 minutos, 23°C). Após cinco dias de incubação, as bactérias foram novamente centrifugadas (3000 g, 15 minutos, 23°C), tendo o sobrenadante descartado e o *pellet* suspenso em solução salina. Depois de dois ciclos de centrifugação, as bactérias foram ressuspensas em 50 mL de solução salina, aliquotadas, liofilizadas (Hetovac® model CT110, Birkerød, Denmark) durante sete horas e congeladas. No momento do experimento, uma alíquota de bactérias foi descongelada e cultivada em 50 mL de meio BHI, a 37°C durante 20 horas. Após a incubação, essa cultura foi centrifugada, ressuspensa em solução salina estéril 0,9% e centrifugada novamente (3000 g, 15 minutos, 23°C). O *pellet* foi ressuspendido em 10 mL de solução salina estéril. A concentração das bactérias foi avaliada por espectrofotometria a 600 nm (Molecular Devices, Sunnyvale, USA), tendo como unidade de medida UFC/mL (UFC – unidade formadora de colônia).

3.3. Indução da sepse

As bactérias obtidas foram inoculadas via intraperitoneal em camundongos C57BL/6 com duas e seis semanas. Os infantes foram mantidos na caixa em contato com a mãe. Uma vez induzida a sepse, estes animais foram tratados com Ertapenen sódico a uma concentração de 30 mg/Kg (animais seis semanas) e 15 mg/Kg (animais de duas semanas). O tratamento foi iniciado seis horas após a indução da sepse, e reaplicado a cada doze horas durante três dias, juntamente com administração de salina 0,9% para reposição volêmica.

3.4. Bacteremia pós-sepse

A contagem de bactérias foi determinada como previamente descrito (GODSHALL, C. J. *et al.*, 2002). Resumidamente, os camundongos foram sacrificados 6h, 24h e nos dias 7 e 15 após a indução da sepse para coleta de amostras de sangue do seio venoso supraorbitário. O material obtido foi semeado em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton (Oxoid Limited, Hampshire, UK) e incubados a 37°C. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi avaliado após 24 horas da semeadura. Os resultados foram expressos como o logaritmo das UFCs por mililitro de sangue.

3.5. Determinação da concentração sérica de Transaminase Glutâmico-Oxalacético

A função hepática foi avaliada através da dosagem sérica da enzima Transaminase Glutâmico-oxalacético (TGO). Os camundongos foram sacrificados seis horas, 24 horas e, 7 e 15 dias após a indução da sepse, como também o grupo controle, para coleta de amostras de sangue do seio venoso supraorbitário, do qual fio extraído o soro. A dosagem foi feita utilizando um kit de ensaio colorimétrico enzimático comercial (LABTEST Diagnóstica-Brasil) como previamente descrito (FREITAS, A. *et al.*, 2011). Os valores foram expressos em U/mL.

3.6. Avaliação de integridade da Barreira Hematoencefálica

Foi utilizado a metodologia de azul de Evans para avaliação de permeabilidade da barreira hematoencefálica 24 horas após indução de sepse. Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intravenosa de azul de Evans na dose de 20 mg/kg de peso. Uma hora após, os animais foram novamente anestesiados para a perfusão com salina, seguida da extração dos encéfalos, os quais foram imersos em Formamida e incubados por 24 horas a 22°C para extração de Azul de Evans do tecido. Em seguida, o corante foi extraído pela formamida e conservado à temperatura constante de - 20°C para posterior leitura espectrofotométrica, a 610nm (SARIA, A. and LUNDBERG, J.M., 1983).

3.7. Determinação das concentrações de citocinas

As amostras de homogeneizado encefálico foram coletadas 24 horas após a indução da sepse. A determinação dos níveis de IL-1 β , IL-6 e MCP-1 e KC foi feita por método imunoenzimático (ELISA), com um kit comercial (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), de acordo com o fabricante. As concentrações foram expressas como pg/mL.

3.8. Perfusão intracardíaca e preparação de cortes histológicos

24 horas após a indução da sepse, como também 15 e 30 dias após, os camundongos foram anestesiados e, em seguida, submetidos a toracotomia para expor o coração. Uma agulha foi inserida no ventrículo esquerdo, através da qual PBS e Paraformaldeído tamponado (PFA) 4% foram administrados com o auxílio de uma bomba peristáltica. Depois de completar a perfusão, os animais foram decapitados, os cérebros foram removidos e armazenados em PFA tamponado a 4% *overnight*. Posteriormente, os cérebros foram movidos para solução de sacarose a 30% até saturação completa e, em seguida, congelados em gelo seco e armazenados a -80°C. Os cérebros foram cortados em seções de 30 μ m de espessura a -20°C com o auxílio de um criostato (BELLOZI, P.M. et al, 2016).

3.9. Imunofluorescência Indireta

Amostras do hipocampo foram lavadas 3 vezes em solução salina tamponada com Tris (TBS) durante 30 minutos. As amostras em fatias de flutuação livre (*free-floating*) foram incubadas com tampão citrato a 70°C por 30 minutos, para recuperação antigênica. Logo após, a solução de bloqueio [BSA (1%), Triton X (0,5%) em TBS] foi adicionado às fatias por 3 horas e, em seguida, foram incubadas *overnight* com anticorpo primário. No dia seguinte, as fatias foram incubadas com o anticorpo secundário por 2 horas, lavadas, montadas em lâminas gelatinizadas e laminadas com meio Vectashield with DAPI. As lâminas foram observadas sob um microscópio de fluorescência.

3.10. Teste de Reconhecimento de Objetos

Este teste avalia memória não-aversiva. No primeiro dia do teste os animais foram habituados durante 5 minutos em uma caixa quadrada acrílica, dimensões 380 × 380 × 15 mm (comprimento × largura × altura), cobertas com maravalha. No segundo dia de teste os animais foram reexpostos à caixa em que 2 objetos iguais foram introduzidos diagonalmente, sendo esta etapa denominada treino, por um período de 10 minutos. 24 horas após a sessão de treino foi realizado o teste, onde um dos objetos antigos (OA) foi substituído por um novo objeto (ON), tendo duração de 5 minutos, registrando a memória a longo prazo (*long term memory*). O índice de reconhecimento foi obtido pelas fórmulas: $\text{tempo ON} \times 100 / (\text{tempo NO} + \text{tempo OA})$ (BELLOZI, P.M. et al, 2016).

3.11. Imunohistoquímica para DCX

Para a detecção de DCX 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 min. Após mais 3 lavagens em PBS 0,1M, os cortes foram incubados no bloqueio de peroxidase: PBS 0,1M, contendo 3% de H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após o bloqueio, 3 lavagens com PBS 0,1M acrescido com 0,3% de Triton-X 100 foram feitas. Depois, os cortes

foram incubados em solução contendo 2% de soro albumina bovino 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-DCX (1:300, Santa Cruz Biotechnology, California, USA) em TA, sob agitação constante a 4°C. Terminado 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, USA), biotinilados, em uma solução TA, sob agitação constante, a temperatura ambiente. Seguiram para 3 lavagens com TA e posteriormente, foram incubados com o complexo avidina-biotina (ABC; Kit, Vector Laboratories, California, USA) em TA, por mais 2 horas sob agitação constante, em temperatura ambiente. Terminada a ligação ao complexo ABC, foram feitas 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% H₂O₂, acrescida a 51 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 PBS 0,1M, sendo então feita a montagem das lâminas previamente gelatinizadas. Para as marcações foi feita a desidratação e diafanização com xilol, as lâminas foram cobertas com Permount® (Fisher Scientific, New Jersey, EUA) e lamínulas.

3.12. Análise estatística

Todos os dados obtidos foram analisados pelo programa GraphPad PRISM (Versão 6.00, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). A sobrevivência dos animais foi expressa como porcentagem de animais sobreviventes, analisadas pelo teste Mantel-Cox logrank X², chi-squared. A contagem de bactérias foi expressa como mediana do Log de UFC e analisada estatisticamente pelo teste Mann-Whitney *U*. Os valores foram apresentados como média ± erro padrão da média de *n* experimentos. A diferença entre os valores médios foram analisadas através do teste *t* de Student não pareado, ou ANOVA seguido de Tukey para comparações múltiplas. Diferenças significativas foram consideradas quando o valor de *p* < 0,05.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Padronização do modelo experimental de sepse por inoculação de bactérias em camundongos infantis.

O método escolhido foi a administração intraperitoneal de uma suspensão polimicrobiana previamente obtida do ceco de um camundongo adulto C57BL/6, como descrito anteriormente. A densidade ótica das bactérias isoladas foi correlacionada com o número de unidades formadoras de colônias (UFC) cultivadas em Agar Müller-Hinton, permitindo o cálculo do número de UFC necessário para a indução da sepse em cada grupo experimental. Posteriormente, animais infantis e adultos foram inoculados (i.p.) com quantidades diferentes de suspensão bacteriana e a sobrevivência foi determinada diariamente durante os cinco dias subsequentes (Figura 4). Foram utilizadas as concentrações 1×10^7 UFC/cavidade, 2×10^7 UFC/cavidade e 3×10^7 UFC/cavidade para análise de sobrevivência em animais infantis (Figura 4, A) e, para os adultos, 7×10^7 UFC/cavidade, 8×10^7 UFC/cavidade e 9×10^7 UFC/cavidade (Figura 4, B).

Deste ponto em diante, os experimentos foram realizados utilizando como dose bacteriana letal 2×10^7 UFC/cavidade para animais infantis e 8×10^7 UFC/cavidade para animais adultos, seguindo o protocolo de antibioticoterapia.

Figura 4. Efeito da sepse sobre a sobrevivência de animais infantis e adultos. Animais (A) infantis (duas semanas de idade) e (B) adultos (seis semanas de idade) foram submetidos à sepse pela inoculação de bactérias (i.p.) em concentrações variadas. A sobrevivência dos camundongos foi avaliada a cada doze horas por um período de cinco dias, com resultados expressos em % de sobrevivência (n=8 camundongos por grupo).

4.2. Caracterização da fase aguda de camundongos C57BL/6 infantes e adultos submetidos à sepse e validação de modelo experimental em infantes.

Uma vez estabelecida a carga bacteriana a ser utilizada para indução da sepse, o nosso próximo passo foi investigar o *clearance* bacteriano nos animais infantes e adultos submetidos à sepse. Observamos que camundongos infantes e adultos apresentaram um aumento significativo da contagem de bactérias no sangue seis horas após a indução da sepse, a qual teve sua diminuição gradativa até o 15º dia, onde foi equivalente a zero, demonstrando eficácia da antibiótico-terapia com Ertapenem sódico (Figuras 5, B). Os níveis de bactéria no sangue de camundongos infantes seis horas após a indução de sepse é significativamente maior do que o observado em camundongos adultos submetidos ao mesmo modelo experimental.

Uma vez que camundongos infantes apresentaram uma maior susceptibilidade à sepse experimental, o nosso próximo objetivo foi avaliar a gravidade dos danos orgânicos através de marcadores de lesão. Os níveis séricos de Transaminase Glutâmico-oxalacético (TGO) em camundongos infantes e adultos seis horas após a indução de sepse mostraram-se elevados, indicando presença de lesão hepática (Figura 5, C). Os níveis de TGO retornam à normalidade conforme há a recuperação dos animais. Também pode-se observar que o aumento dos níveis séricos de TGO em infantes submetidos à sepse é significativamente maior que o aumento observado em adultos submetidos ao mesmo modelo, ressaltando a maior susceptibilidade dos infantes à sepse.

Baseado nestes dados, seguimos nossos estudos apenas com animais infantes, uma vez que conseguimos validar nosso modelo experimental de sepse em infantes, devido este modelo apresentar uma maior mortalidade e disfunção orgânica quando comparado a adultos, assim como é descrito na literatura.

Figura 5. Camundongos infantis são mais susceptíveis à sepse experimental. Animais infantis (duas semanas de idade) e adultos (seis semanas de idade) foram submetidos à sepse pela inoculação de bactérias (i.p) na concentração de 2×10^7 UFC/mL e 8×10^7 UFC/mL, respectivamente, e tratados com Ertapenem sódico por 3 dias ($n=10-20$ camundongos por grupo). (A) A sobrevivência dos camundongos foi avaliada diariamente por um período de cinco dias, com resultados expressos em % de sobrevivência. (B) A quantificação das bactérias viáveis presentes no sangue foi realizada 6 horas após a infecção e acompanhada, também, 1, 7 e 15 dias após. Os dados correspondem ao logaritmo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL de sangue. (C) Concentrações séricas de TGO realizada 6 horas após a infecção e acompanhada, também, 1, 7 e 15 dias após. Dados representativos de três experimentos independentes. (* $p<0,05$ infante versus adulto).

4.3. Sepsé causa aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, produção de citocinas no encéfalo com ativação de células da glia.

Nosso próximo passo foi avaliar a integridade da BHE em nosso modelo experimental. Como descrito anteriormente, 24 horas após a indução da sepsé em animais infantis, a integridade da BHE foi avaliada utilizando Azul de Evans. Observamos que houve aumento significativo de Azul de Evans no encéfalo de camundongos 24 horas após indução da sepsé, demonstrando que houve rompimento da BHE (Figura 6).

Figura 6. Sepsé polimicrobiana aumenta permeabilidade da Barreira Hematoencefálica em camundongos. Animais infantis submetidos à sepsé pela inoculação de bactérias (i.p) e, após 24 horas foi administrado Azul de Evans (20 mg/Kg) (i.v.) para avaliação da integridade da BHE (n=5 camundongos por grupo). Os resultados são expressos em microgramas de Azul de Evans por miligramas de tecido. Os resultados são expressos no valor de citocinas por mg de proteína do tecido, analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey e expostos como média $\pm$ EPM.. Dados representativos de dois experimentos independentes. (* $p < 0,05$ sepsé infante versus sham infante).

Uma vez que nossos resultados mostraram comprometimento da BHE em camundongos infantis submetidos à sepsé, nosso próximo passo foi avaliar os níveis de citocinas e quimiocinas no encéfalo destes animais, uma vez que durante processos neuroinflamatórios as citocinas podem desempenhar um papel crucial na patogênese da lesão. Observamos que 24 horas após a indução da sepsé há aumento significativo das citocinas IL-1 β e IL-6 e das quimiocinas KC e MCP-1 (Figura 7), no encéfalo de camundongos infantis. Curiosamente, embora foi observado o aumento de citocinas e quimiocinas, não houve infiltrado leucocitário no

tecido (Figura 8). Porém, observamos que há maior ativação de células da glia: micróglia e astrócitos, 24 horas após a indução da sepse em camundongos infantis (Figura 9).

Figura 7. Sepse polimicrobiana aumenta produção de citocinas em encéfalo de camundongos. Avaliação da concentração de citocinas e quimiocinas por ELISA em encéfalo de camundongos infantis 24 horas após de indução de sepse por inóculo de bactérias (i.p.) (n=5 camundongos por grupo). Os resultados são expressos no valor de citocinas por mg de proteína do tecido, analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey e expostos como média $\pm$ EPM. Dados representativos de dois experimentos independentes (* $p < 0,05$ sepse infante *versus* sham infante).

Figura 8. A sepse aumenta a produção de citocinas no encéfalo de camundongos infantis, porém sem infiltrado leucocitário. Animais infantis foram submetidos à sepse polimicrobiana e, após 24 horas, os animais foram anestesiados e perfundidos, seguida da coleta do encéfalo. O tecido foi submetido à técnica de imunofluorescência para a estimativa de infiltrado leucocitário, através da marcação de Ly6G, complexo antigênico presente em neutrófilos periféricos. Os blocos da segunda coluna, em azul, indicam os núcleos celulares, através da marcação da molécula 4",6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Nos blocos da terceira coluna, o merge, podemos observar que não houve marcação de células por Ly6G/Ly6C. Imagens representativas e um experimento, aumento de 10x (n=5 camundongos por grupo).

Figura 9. A sepse polimicrobiana leva a ativação de células da glia em encéfalo de camundongos infantis. Animais infantis foram submetidos à sepse polimicrobiana e, após 24 horas, os animais foram anestesiados e perfundidos, seguida da coleta do encéfalo. O tecido foi submetido à técnica de imunofluorescência para avaliação de ativação de células de glia, através da marcação de IBA-1 (micróglia) e GFAP (astrócito). Os blocos da terceira coluna, em azul, indicam os núcleos celulares, através da marcação da molécula 4",6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Imagens representativas e um experimento, aumento de 10x (n=5 camundongos por grupo).

4.4. Camundongos infantis sobreviventes a sepse apresentam déficit de aprendizagem a longo prazo.

O comprometimento cognitivo pós-sepse é uma das principais sequelas observadas em sobreviventes. Nesse sentido, para avaliação de memória de aprendizado, utilizamos o teste de reconhecimento de objeto nos animais sobreviventes à sepse. Podemos observar que 15 e 30 dias após a indução da sepse polimicrobiana e tratamento com Ertapenem sódico, os animais infantis sobreviventes apresentaram um menor índice de discriminação entre o objeto novo e o familiar, sugerindo um déficit de memória de aprendizado (Figura 10).

Figura 10. Camundongos infantis sobreviventes a sepse polimicrobiana apresentam déficit de memória de aprendizado. Animais infantis submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com Ertapenem sódico foram submetidos à teste comportamental de Memória de Reconhecimento de Objeto 15 e 30 dias após a indução da sepse. (A) Animais infantis 15 dias após sepse; (B) Animais infantis 30 dias após sepse.

4.5. Camundongos infantis sobreviventes a sepse apresentam redução de neurogênese hipocampal.

Para avaliação da neurogênese hipocampal, foi realizada a contagem de células doblecortina (DCX) no giro denteado do hipocampo em animais infantis 15 e 30 dias após a indução da sepse. Observamos que houve uma redução da quantidade de células DCX no giro denteado do hipocampo de camundongos infantis sobreviventes a sepse (Figura 11).

Figura 11. Camundongos infantis sobreviventes à sepse diminuem a neurogênese do hipocampo. O tecido foi submetido à técnica imuno-histoquímica para a determinação de células precursoras neuronais, marcando DCX. Dados representativos de dois experimentos independentes analisados por ANOVA, seguidos pelo teste de Tukey e expostos como média $\pm$ SEM (* $p < 0,05$ sepse versus sham).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos demonstram que a mortalidade na sepse neonatal é significativamente maior que em adultos (MARTINOT, A. *et al.*, 1997; WATSON, R. S. *et al.*, 2003; LAWN, J. E. *et al.*, 2005). Tal característica foi o critério para a padronização e determinação da concentração a ser utilizada para indução da sepse em nosso modelo experimental. O sistema imune neonatal é prejudicado em termos de número e atividade funcional de seus efetores, cujos neutrófilos e monócitos apresentam uma capacidade reduzida de atingir o local da inflamação, assim como há menor produção de citocinas (CAPASSO, L. *et al.*, 2015), podendo resultar na deficiência da função antimicrobiana, o que é observado nos camundongos infantes submetidos ao nosso modelo experimental de sepse, caracterizada pela diminuição da atividade bactericida, levando a uma maior susceptibilidade à sepse experimental. Por outro lado, não podemos excluir que a maior susceptibilidade dos neonatos a sepse seja devido a uma ativação descontrolada da resposta imune que medeiam as lesões sistêmicas. A ativação acentuada das células inflamatórias resulta na produção e secreção de altas concentrações de mediadores pró-inflamatórios, tornando-se responsável pela maioria das alterações fisiopatológicas tais como, lesões teciduais e disfunção de órgãos observadas tanto em pacientes como em modelos experimentais de sepse (DINARELLO, C. A. 1997; ALVES-FILHO, J. C. *et al.*, 2006; SINGH, S. and EVANS, T. W., 2006; ALVES-FILHO, J. C. *et al.*, 2008; DE MONTMOLLIN, E. and ANNANE, D., 2011). Em nosso modelo podemos observar que a sepse em animais infantes e adultos levou ao aumento nos níveis de TGO, enzima hepática que quando presente em altas concentrações no sangue, indica a ocorrência de lesão de hepatócitos, o que pode resultar em comprometimento da função hepática.

Além da imaturidade da resposta imune em neonatos, também há a imaturidade do sistema nervoso central (SNC), tornando o cérebro vulnerável a danos por inflamação mal controlada e penetrante, como ocorre na resposta à inflamação sistêmica (STRUNK, T. *et al.*, 2014). Nosso próximo passo foi investigar as possíveis alterações fisiopatológicas que poderiam acometer o SNC. Os mecanismos exatos que causam disfunção cerebral em pacientes sépticos adultos ainda não estão totalmente esclarecidos, entretanto, é sabido que a fisiopatologia da EAS envolve a ruptura da BHE (BLOM, C. *et al.*, 2015). Durante processos

neuroinflamatórios, como ocorre em traumas e isquemias, por exemplo, citocinas desempenham um papel crucial na patogênese da lesão, uma vez que há interação com células da glia e células endoteliais, prejudicando, assim, a estabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) (PAN, W. et al, 2011). Em nosso trabalho, observamos ruptura da barreira hematoencefálica e aumento da produção de citocinas e quimiocinas no cérebro de animais infantis submetidos à sepse.

Dentre as células da glia estão as micróglia e os astrócitos. Micróglia são os fagócitos profissionais do cérebro e eliminam células inteiras ou subestruturas celulares, e também são descritas como influenciadoras positivas em células precursoras neuronais (Wolf et al, 2017). Expressam, assim como macrófagos, uma proteína de ligação de cálcio específica, amplamente utilizada para sua marcação, a molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (IBA-1). As micróglia possuem duas conformações: repouso (morfologicamente "ramificada") ou em um estado ativado (morfologicamente "Amebóide"), sendo que a ativação microglial ocorre sob qualquer tipo de insulto patológico no cérebro (KETTENMANN et al, 2011). A sepse em humanos também está associada à ativação de micróglia, tal fato relatado pela primeira vez por Lemstra e colaboradores (2007), que observaram um aumento acentuado de micróglia ativadas no tecido cerebral de pacientes adultos (37 a 92 anos) que morreram de sepse. Nosso trabalho sugere que o mesmo ocorre em infantis, sendo que em nosso modelo claramente podemos observar que, através da marcação com IBA-1, há a modificação conformacional da célula em repouso (sham) para o estado ativado (sepse) (figura 9). Esta ativação é consequência da desestabilização da BHE e aumento de citocinas e quimiocinas relatadas anteriormente.

Os astrócitos são o tipo de célula da glia mais abundantes no SNC, sendo essenciais para a manutenção da homeostase cerebral (ARAQUE ET AL., 2014, DALLÉRAC AND ROUACH, 2016). Graças à sua localização estratégica em contato próximo com as células residentes do SNC e vasos sanguíneos, os astrócitos participam da manutenção e permeabilidade da BHE, como também desempenham um papel no controle de tráfego e ativação de células imunológica, uma vez que são células imunocompetentes capazes de detectar sinais de perigo, respondendo através da secreção de citocinas e quimiocinas e ativam adaptativos defesa imunológica (Colombo & Farina, 2016). Expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês *glial fibrillary acidic protein*) é amplamente utilizada para a

identificação desta célula *in vivo* e *in vitro*, e a regulação positiva deste marcador nos astrócitos é uma característica típica das patologias do SNC (SOFRONIEW, 2009). Observamos que o processo inflamatório sistêmico desencadeado pela sepse em nossos animais infantis levou a ativação astrocítica, o que fica claro pela maior expressão de GFAP pelas células de animais sépticos quando comparados ao grupo controle, podendo ainda observar que esta ativação se torna maior nas regiões onde há delimitação da BHE. Segundo a literatura, essa intensa ativação de células da glia com produção de mediadores inflamatórios e componentes neurotóxico, leva a alterações na reorganização substantiva do tecido e mudanças estruturais que são duradouras, podendo persistir por muito depois da resolução do inflamatório (SOFRONIEW & VINTERS, 2010; Colombo & Farina, 2016).

O comprometimento cognitivo pós-sepse é uma das principais sequelas observadas em sobreviventes, podendo este comprometimento ser global ou afetar domínios específicos (CALSAVARA, A. J. C. et al, 2017). Esses déficits têm sido grande alvo de estudos na atualidade devido ao grande impacto que este causa na vida tanto do paciente, assim como ao sistema de saúde. Alterações de memória são as queixas mais frequentes, sendo observada tanto durante o período de internação, como até anos após a alta hospitalar, sugerindo que a EAS pode levar a persistente comprometimento das funções cerebrais (Schuler et al., 2018). Entretanto, como na literatura não existem dados consistentes sobre alterações cognitivas decorrentes de sepse pediátrica, principalmente os relacionados a memória, nosso próximo passo foi investigar possíveis alterações em aquisição de memória em nossos animais sobreviventes à sepse em fases que se aproximariam de sua adolescência (15 dias) e idade adulta (30 dias).

O termo aprendizado é utilizado para designar um primeiro estágio da memória que é a aquisição de novas informações provenientes do ambiente, enquanto o termo memória diz respeito ao processo de consolidação, a curto ou longo prazo, de conhecimentos ou eventos, associados à capacidade de evocar e utilizados quando necessário (TULVIN, 1987). Sua importância reside no fato que o indivíduo pode alterar seu comportamento ou decisões, baseado em experiências prévias, que lhe conferem uma vantagem adaptativa frente a diversos fatores que a sobrevivência impõe, facilitando, por exemplo, o forrageio de alimentos, reconhecimento de padrões de um predador (ex: odor) entre outros (HELENE & XAVIER, 2007). O comportamento é a expressão mais notória do funcionamento do

sistema nervoso. Por meio do comportamento é possível deduzir que há evocação de memórias em animais. Exemplos disso ocorrem na supressão de um comportamento inato (como deixar de explorar um ambiente devido à presença de um estímulo aversivo nesse ambiente) ou aquisição de um comportamento “não natural” (como acionar uma alavanca diversas vezes mediante estímulos apetitivos). Durante a fase de evocação, as memórias podem se tornar instáveis por um período de tempo limitado, podendo ser novamente estabilizadas, num processo conhecido como reconsolidação da memória (SARA, 2000; MONFILS e col., 2009) ou extintas (HERRY e col., 2010). Observamos que animais infantis sobreviventes à sepse apresentaram déficit de memória, podendo esse dano cognitivo ser resultante de comprometimento neuronal devido à inflamação sistêmica.

Utilizamos como ferramenta de estudo o teste comportamental de reconhecimento de objeto, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido, para avaliar memória e aprendizado (LUEPTOW, 2017). Observamos que o índice de discriminação dos animais sobreviventes foi menor quando comparado ao do grupo controle (de mesma idade), ou seja, houve um déficit na aquisição de memória a longo prazo, sugerindo que o dano causado no SNC causado pela sepse na infância pode ser persistente até sua vida adulta.

Porque o hipocampo é fortemente associado à aprendizagem e memória, essas descobertas levou os pesquisadores a hipotetizar que a neurogênese pós natal poderia desempenhar papéis funcionais na cognição humana. Embora a proporção de neurônios nascidos adultos é uma população menor em comparação com o número total de neurônios do giro denteado, a adição contínua de novos neurônios ao longo da vida (aproximadamente 700 células por dia em humanos) implica que a neurogênese adulta poderia adicionar plasticidade estrutural e funcional substancial aos circuitos tri-sinápticos de o hipocampo (Spalding et al. 2013). Neuroplasticidade refere-se à capacidade do sistema nervoso de mudar, adaptar-se e moldar-se a nível estrutural e funcional ao longo do desenvolvimento neuronal e quando sujeito a novas experiências. Duas áreas foram identificadas com capacidade neurogênica, a zona subventricular, que se situa lateralmente aos ventrículos cerebrais, e a zona subgranular do giro dentado no hipocampo (BONAGUIDI et al. 2011). As células doublecortina (DCX) são progenitoras neuronais presentes no hipocampo, assim sua redução está diretamente relacionada

a redução de neurogênese (TODA & GAGE, 2017). Ao quantificar estas células no hipocampo de animais sobreviventes á sepse, observamos uma redução destas células, indicando uma possível redução na neurogênese hipocampal como mais uma sequela da sepse.

Em nosso trabalho, ao observar a redução na quantidade de células DCX no hipocampo dos camundongos sobreviventes, juntamente com o déficit de memória apresentado por estes, podemos observar que possivelmente, o processo inflamatório sistêmico intenso afetou a neurogênese hipocampal destes animais, resultando no dano cognitivo de memória. Estudos em que foi realizada a administração periférica de LPS, demonstrou que houve a interrupção da proliferação de células progenitoras neurais (KOHMAN & RHODES, 2013; ZONIS et al., 2013), diminuição da diferenciação em neurônios e redução a sobrevivência de neuroblastos (EKDAHL et al., 2003; MONJE et al., 2003). Ainda, experimentos com injeções intraventriculares de LPS (BORSINI et al., 2015; EKDAHL et al., 2009; KOHMAN & RHODES, 2013) e estudos *in vitro* (BORSINI et al., 2015) mostram que, durante uma resposta imune inata, citocinas e micróglias ativadas são, em grande parte, responsáveis pela diminuição da neurogênese. Deve-se notar que, embora a inflamação aguda ocorra dentro de um período de tempo limitado, os efeitos disruptivos sobre a neurogênese podem durar mais por causa do tempo necessário para o neurônios recém-desenvolvidos para amadurecer e se integrar ao circuito neuronal.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho demosntramos que a sepse em animais infantis leva ao déficit de memória. Nossos dados sugerem que a produção de mediadores inflamatórios e lesão no SNC durante a sepse regulam negativamente a neurogênese hipocampal, a qual é essencial para manutenção da memória.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- ALTMAN J, DAS GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol**. 1965. 124:319–335
- ALTMAN J, DAS GD. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. **J Comp Neurol**. 1966.
- ALTMAN J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? **Science**. 1962.
- ALTMAN J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. **Anat Rec**. 1963.
- ALVES-FILHO JC, BENJAMIM C, TAVARES-MURTA BM, CUNHA FQ. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2005.
- ALVES-FILHO JC, FREITAS A, SOUTO FO, SPILLER F, PAULA-NETO H, SILVA JS, GAZZINELLI RT, TEIXERA MM, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2009.
- ALVES-FILHO, J. C. et al. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v. 30 Suppl 1, p. 3-9, Oct 2008.
- ALVES-FILHO, J. C. et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med**, v. 34, n. 2, p. 461-70, Feb 2006.
- ARAQUE A., CARMIGNOTO G., HAYDON P.G., OLIET S.H.R., ROBITAILLE R., VOLTERRA A. Gliotransmitters travel in time and space. **Neuron**. 2014.
- BALAMUTH, F., WEISS, S.L., NEUMAN, M.I. et al. Pediatric severe sepsis in U.S. children's hospitals. **Pediatr Crit Care Med**. 2014. 15:798–805
- BELLOZI, P.M. et al. Neuroprotective effects of the anticancer drug NVP-BEZ235 (dactolisib) on amyloid- β 1-42 induced neurotoxicity and memory impairment. **Sci Rep**. 2016.

BENJAMIM CF, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Role of nitric oxide in the failure of the neutrophil migration in sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**. 2000.

BLISS, T. V. P.; LØMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of Physiology**, v. 232, n. 2, p. 331–356, 1 jul. 1973.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 7 jan. 1993.

BLOM, C. et al. Human severe sepsis cytokine mixture increases β 2-integrin-dependent polymorphonuclear leukocyte adhesion to cerebral microvascular endothelial cells in vitro. **Crit. Care**. 2015

BONAGUIDI MA, SONG J, MING GL, SONG H. A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. **Curr Opin Neurobiol**. 2012.

BONAGUIDI MA, WHEELER MA, SHAPIRO JS, STADEL RP, SUN GJ, MING GL, SONG H. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. **Cell**. 2011.

BONE RC, SIBBALD WJ, SPRUNG CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest**. 1992.

BORREGAARD N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immuniy**. 2010.

BORSINI A, ZUNZAIN PA, THURET S, PARIANTE CM. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. **Trends Neurosci**. 2015.

BOZZA, F.A. et al. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. **Shock**. 2013.

BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D.S., WEINRAUCH, Y., ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**. 2004;303(5663):1532–5.

CALSAVARA, A. J. C. et al. Post-Sepsis cognitive impairment and associated risk factors: A systematic review. **Aust Crit Care**. 2017

CAMERON HA, MCKAY RD. Restoring production of hippocampal neurons in old age. **Nat Neurosci**. 1999. 2:894–897

CAPASSO, L. et al. Role of immunoglobulins in neonatal sepsis. **Transl Med UniSa**. 2015

COLOMBO, E., & FARINA, C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. **Trends in Immunology**,.2016.

COLÓN DF, WANDERLEY CW, FRANCHIN M, SILVA CM, HIROKI CH, CASTANHEIRA FVS, DONATE PB, LOPES AH, VOLPON LC, KAVAGUTI SK, BORGES VF, SPECK-HERNANDEZ CA, RAMALHO F, CARLOTTI AP, CARMONA F, ALVES-FILHO JC, LIEW FY, CUNHA FQ. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. **Crit Care**. 2019 Apr 8;23(1):113.

CORKIN, S. Tactually-guided maze learning in man: Effects of unilateral cortical excisions and bilateral hippocampal lesions. **Neuropsychologia**, v. 3, n. 4, p. 339–351, nov. 1965.

CROSARA-ALBERTO DP, DARINI AL, INOUE RY, SILVA JS, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. **British Journal in Pharmacology**. 2002.

DALLÉRAC G., ROUACH N. Astrocytes as new targets to improve cognitive functions. **Prog. Neurobiol**. 2016

DE MIRANDA, A. S., ZHANG, C.-J., KATSUMOTO, A., & TEIXEIRA, A. L. (2017). Hippocampal adult neurogenesis: Does the immune system matter? **Journal of the Neurological Sciences**. 2017.

DE MONTMOLLIN, E. and ANNANE, D. Year in review 2010: Critical Care--Multiple organ dysfunction and sepsis. **Crit Care**, v. 15, n. 6, p. 236, 2011.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, v. 112, n. 6 Suppl, p. 321S-329S, Dec 1997.

ECKENHOFF MF, RAKIC P. Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. **J Neurosci**. 1988.

EICHENBAUM, H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 109–120, 30 set. 2004.

EKDAHL CT, CLAASEN JH, BONDE S, KOKAIA Z, LINDVALL O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003.

EKDAHL CT, KOKAIA Z, LINDVALL O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. **Neuroscience**. 2009;

ENCINAS JM, MICHURINA TV, PEUNOVA N, PARK JH, TORDO J, PETERSON DA, FISHELL G, KOULAKOV A, ENIKOLOPOV G. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. **Cell Stem Cell**. 2011. 8:566–579

FLEISCHMANN-STRUZEK, C.; GOLDFARB, D.M., SCHLATTMANN, P. et al. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. **Lancet Respir Med**. 2018.

FREITAS, A. et al. Divergent role of heme oxygenase inhibition in the pathogenesis of sepsis. **Shock**, v. 35, n. 6, p. 550-9, Jun 2011.

GODSHALL, C. J. et al. Genetic background determines susceptibility during murine septic peritonitis. **J Surg Res**, v. 102, n. 1, p. 45-9, Jan 2002.

GOLDSTEIN, B. et al. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. **Pediatr Crit Care Med**. 2005.

GONIN, M. L. C. Atualidades na Sepse e Choque Séptico Pediátrico. **Revista de Pediatria SOPERJ**, 2012.

GÖTZ, T. et al. The loss of neural synchrony in the post septic brain. **Clin Neurophysiol** 2017.

GOULD E, MCEWEN BS, TANAPAT P, GALEA LA, FUCHS E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **J Neurosci**. 1997. 17:2492–2498

HELENE, A & XAVIER, GF. 2007. Memória e (a Elaboração da) Percepção, Imaginação, Inconsciente e consciência. In: Ladeira-Fernandez, J e Silva, M. T. A. (ed.) Intersecções entre psicologia e neurociências, 1a edição. MedBook, Rio de Janeiro, pp 103-148.

HEMING, N. et al. Neuroanatomy of sepsis-associated encephalopathy. **Crit Care**. 2017.

HERRY C, FERRAGUTI F, SINGEWALD N, LETZKUS JJ, EHRLICH I, LÜTHI A. Neuronal circuits of fear extinction. **Eur J Neurosci**.2010. 31(4):599-612.

IWASHYNA, T. J. et al. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. **JAMA** 2010.

IZQUIERDO I. **Memória**. Porto Alegre, Ed. Artmed, 2002.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science** (New York, N.Y.), v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2 nov. 2001.

KAPLAN MS. Formation and turnover of neurons in young and senescent animals: an electronmicroscopic and morphometric analysis. **Ann N Y Acad Sci**. 1985.

KEMPERMANN G, KUHN HG, GAGE FH. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1997a

KEMPERMANN G, KUHN HG, GAGE FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**. 1997b.

KESNER, R. P. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. **Learning & Memory** (Cold Spring Harbor, N.Y.), v. 14, n. 11, p. 771–781, nov. 2007.

KETTENMANN H, HANISCH UK, NODA M, VERKHRATSKY A. Physiology of microglia. **Physiol Rev**. 2011.

KOHMAN RA, RHODES JS. Neurogenesis, inflammation and behavior. **Brain Behav Immun.** 2013;

KUHN HG, DICKINSON-ANSON H, GAGE FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. **J Neurosci.** 1996. 16:2027–2033

KUHN HG, DICKINSON-ANSON H, GAGE FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. **J Neurosci.** 1996. 16:2027–2033

LAWN, J. E.; COUSENS, S.; ZUPAN, J. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? **Lancet**, v. 365, n. 9462, p. 891-900, Mar 5-11 2005.
Learn Mem. 2000. 7:73-84.

LEMSTRA AW, WOULD JCG. I'T, HOOZEMANS JJ, VAN HAASTERT ES, ROZEMULLER AJ, EIKELENBOOM P, et al. Microglia activation in sepsis: a case–control study. **J Neuroinflammation.** 2007.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios** - 2a Ed. Editora: Atheneu, 2010.

LEVY MM, FINK MP, MARSHALL JC, et al. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. International sepsis definitions conference. **Critical Care of Medicine.** 2003.

LUEPTOW, L. M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. **Journal of Visualized Experiments.** 2017.

LUGERT S, BASAK O, KNUCKLES P, HAUSSLER U, FABEL K, GOTZ M, HAAS CA, KEMPERMANN G, TAYLOR V, GIACHINO C. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. **Cell Stem Cell.** 2010. 6:445–456

MACHADO, F. R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **Lancet Infect Dis.** 2017.

MAJNO, G. The ancient riddle of sepsis. **J Infec Dis.** 1991;163: 937.

MARTINOT, A. et al. Sepsis in neonates and children: definitions, epidemiology, and outcome. **Pediatr Emerg Care**, v. 13, n. 4, p. 277-81, Aug 1997.

MONFILS MH, COWANSAGE, KK, KLANN E, LEDOUX JE 2009. Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. **Scie.** 2009. 324: 951-955

MONJE ML, TODA H, PALMER TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science.** 2003.

Neuroscience, v. 34, p. 51–59, 2014.

OPITZ, B. Memory function and the hippocampus. **Frontiers of Neurology and**

PAN, W. et al. Cytokine signaling modulates blood-brain barrier function. **Curr Pharm Des**, 2011.

PANDHARIPANDE, P. P. et al. Long-term cognitive impairment after critical illness. **N Engl J Med.** 2013.

PENFIELD W, PEROT P. The brain's record of auditory and visual experience. A final summary and discussion. **Brain : a Journal of Neurology**, 30 Nov 1963, 86:595-696 DOI: 10.1093/brain/86.4.595

PYTEL, P., ALEXANDER, J.J. Pathogenesis of septic encephalopathy. **Curr. Opin. Neurol.** 2009. 22 (3), 283–287

RAKIC P. Limits of neurogenesis in primates. **Science.** 1985. 227:1054–1056

RICHARD S. HOTCHKISS, LYLE L. MOLDAWER, STEVEN M. OPAL, KONRAD REINHART, ISAIAH R. TURNBULL, AND JEAN-LOUIS VINCENT. Sepsis and septic shock. **Nat Rev Dis Primers.**

RIO-SANTOS F, ALVES-FILHO JC, SOUTO FO, et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophil in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.** 2007.

SARA SJ. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering.

SARIA, A. and LUNDBERG, J.M. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. **J Neurosci Methods.** 1983.

SCHULER, A., WULF, D.A., LU, Y., et al. The Impact of Acute Organ Dysfunction on Long-Term Survival in Sepsis. **Crit. Care Med.** 2018. 46 (6), 843–849.

SCOMPARIN DS. **Envolvimento da PI3Ky no efeito amnésico induzido pela escopolamina em camundongos**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2020.

SCOTT L WEISS, MARK J. PETERS , WALEED ALHAZZANI, MICHAEL S. D. AGUS, et al. Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children. **Intensive care of medicine**, 2020.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**. 1957.

SEKI T, ARAI Y. Temporal and spacial relationships between PSA-NCAM-expressing, newly generated granule cells, and radial glia-like cells in the adult dentate gyrus. **J Comp Neurol**. 1999. 410:503–513

SEMMLER, A. et al. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2013.

SEMMLER, A., WIDMANN, C.N., OKULLA, T., et al. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**. 2013. 84 (1), 62–69

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**. 2016.

SINGH, S. and EVANS, T. W. Organ dysfunction during sepsis. **Intensive Care Med**, v. 32, n. 3, p. 349-60, Mar 2006.

SOFRONIEW MV, VINTERS HV. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**. 2010.

SOFRONIEW, M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends Neurosci**. 2009.

SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. **Memória: da mente às moléculas**. Porto

STRUNK, T. et al. Infection-induced inflammation and cerebral injury in preterm infants. **Lancet Infect Dis**. 2014.

SUH H, CONSIGLIO A, RAY J, SAWAI T, D'AMOUR KA, GAGE FH. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. **Cell Stem Cell**. 2007. 1:515–528

TAVARES-MURTA BM, ZAPAROLI M, FERREIRA RB, et al. Failure of neutrophil chemotactic function in sepsis pacientes. **Critical Care Medicine**. 2002.

TODA, T., & GAGE, F. H. Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. **Cell and Tissue Research**. 2017.

TORRES-DUEÑAS D, BENJAMIM CF, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Failure of neutrophil migration to infectious focus and cardiovascular changes on sepsis in rats: effects of the inhibition of nitric oxide production, removal of infectious focus, and antimicrobial treatment. **Shock**. 2006.

TORRES-DUEÑAS D, CELES MR, FREITAS A, et al. Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. **British Journal of Pharmacology**. 2007.

TREVELIN SC, ALVES-FILHO JC, SÔNEGO F, TURATO W, et al. Toll-like receptor 9 activation in neutrophil impairs chemotaxis and reduces sepsis outcome. **Critical Care Medicine**. 2012.

TULVIN, E. Multiple memory systems and consciousness. **Hum. Neurobiol**. 1987.

TUON, L. et al. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. **Intensive Care Med**, 2008

VAN PRAAG H, KEMPERMANN G, GAGE FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**. 1999. 2:266–270

VINCENT, J.L.; MARSHALL, J.C.; NAMENDYS-SILVA, S.A. et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: The intensive care over nations (ICON) audit. **Lancet Respir Med** 2014;2:380–386.

VOSS, J. L. et al. A Closer Look at the Hippocampus and Memory. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 21, n. 8, p. 577–588, 2017.

- WALKEY, A. J. et al. Trends in sepsis and infection sources in the United States. A population-based study. *Ann Am Thorac Soc* 2015.
- WATSON, R. S. et al. The epidemiology of severe sepsis in children in the United States. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 167, n. 5, p. 695-701, Mar 1 2003.
- WIDMANN, C.N., HENEKA, M.T. Long-term cerebral consequences of sepsis. **Lancet Neurol**. 2014. 13 (6), 630–636.
- WOLF, S. A., BODDEKE, H. W. G. M., & KETTENMANN, H. Microglia in Physiology and Disease. **Annual Review of Physiology**. 2017.
- WYNN, J.L. Defining neonatal sepsis. **Curr Opin Pediatr**, 2016.
- YAO, B. et al. Serum S100 β is a better biomarker than neuron-specific enolase for sepsis-associated encephalopathy and determining its prognosis: A prospective and observational study. **Neurochem Res**, 2014.
- ZHAO, C. et al. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 3–11, 4 jan. 2006.
- ZONIS S, LJUBIMOV VA, MAHGEREFTEH M, PECHNICK RN, WAWROWSKY K, CHESNOKOVA V. p21Cip restrains hippocampal neurogenesis and protects neuronal progenitors from apoptosis during acute systemic inflammation. **Hippocampus**. 2013.