MIKE YOSHIO HAMASAKI

Análise transcriptômica em estruturas encefálicas de
ratos jovens e idosos submetidos ao modelo de ligadura
e perfuração cecal

São Paulo
2018

MIKE YOSHIO HAMASAKI

Análise transcriptômica em estruturas encefálicas de ratos
jovens e idosos submetidos ao modelo de ligadura e
perfuração cecal

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Imunes
e Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Pinheiro da
Silva

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Moraes
Rego Reis

São Paulo
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Hamasaki, Mike Yoshio

Análise transcriptômica em estruturas encefálicas
de ratos jovens e idosos submetidos ao modelo de
ligadura e perfuração cecal / Mike Yoshio Hamasaki. -
- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas.Área de
Concentração: Processos Imunes e Infecciosos.

Orientador: Fabiano Pinheiro da Silva.

Coorientador: Eduardo Moraes Rego Reis.

Descritores: 1.Sepse 2.Encefalopatia associada a
seps 3.Envelhecimento 4.Perfilação da expressão
gênica 5.Transcriptoma 6.Hipocampo 7.Cerebelo
8.Córtex pré-frontal

USP/FM/DBD-130/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: *Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors* (ABNT).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Dedicatória

*Todas palavras existentes de gratidão, amor e respeito são insuficientes e ineficientes em descrever a admiração que tenho pela a minha mãe, **Izabel Aparecida de Camargo**, pessoa à qual dedico essa tese.*

Agradecimentos

Ao professor e orientador **Fabiano Pinheiro da Silva**, por ter me proporcionado a oportunidade de realização deste e de outros trabalhos científicos; pelo investimento de dinheiro, de tempo e de conhecimento durante todo esse período do doutorado, e principalmente, pela honestidade, sinceridade e respeito que sempre predominou entre a nossa relação. Obrigado.

Ao professor Doutor **Marcel Cerqueira Cesar Machado**, pela colaboração, atenção e ensinamentos fornecidos desde as primeiras reuniões em estive presente no laboratório; e pelo auxílio nas correções conceituais e gramaticais deste trabalho.

À professora Doutora **Patrícia Severino**, pela contribuição física e intelectual que foram fundamentais para a execução deste estudo. Meus mais sinceros agradecimentos.

Às Doutoradas **Marcia Kiyomi Koike** e **Camila Hernandes**, por dispor de muitos períodos da semana para auxiliar na parte experimental deste trabalho. Obrigado.

Ao Professor Doutor **Eduardo Moraes Rego Reis** pela coorientação e sugestões que contribuíram para aprimorar este estudo.

À **Janaina Bernarda da Silva**, por me auxiliar incondicionalmente. Obrigado.

Aos amigos, colaboradores e ex-membros do Laboratório de Emergências Clínicas (LIM 51) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **Hermes Vieira Barbeiro**, **Denise Frediane Barbeiro**, **Suely Ariga Kubo**, **Débora Maria Gomes Cunha**, **Rízia Calou Amaral** e **Emerson R. Martins**. Obrigado pela presença e apoio constantes.

À todos os funcionários do Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial, **Kelly**, **Angélica**, **Antônio** e **Geraldo**.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) e a Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pelo apoio financeiro do desenvolvimento do projeto.

Ao ***Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas***, pela oportunidade e facilidades oferecidas.

Ao ***Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein***, pela utilização de seus espaços e recursos.

À todas as outras pessoas que direta ou indiretamente colaboraram com o sucesso deste trabalho.

*“O paradoxo curioso é que
quando eu me aceito como eu
sou, então eu mudo”*

Carl Rogers

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1.	Introdução	
1.1	Sepse.....	1
1.1.1	Conceitos básicos.....	1
1.1.2	Epidemiologia.....	3
1.1.3	Conceitos gerais da fisiopatologia da sepse.....	6
1.1.3.1	Sistema imunológico e sepse.....	6
1.1.3.2	Receptores de reconhecimento de padrões moleculares.....	7
1.1.2	Conceitos específicos da fisiopatologia da sepse.....	8
1.1.2.1	Transcriptômica em sepse.....	8
1.1.2.2	Heterogeneidade da sepse.....	9
1.1.3	Sintomatologia da sepse.....	12
1.2	Encefalopatia associada à sepse.....	14
1.2.1	Aspectos gerais.....	14
1.2.2	Interações entre o sistema imunológico e o sistema nervoso.....	15
1.2.3	Efeitos da inflamação sobre o SNC.....	18
1.2.4	Efeitos da sepse no SNC de idosos; um viés na literatura científica.....	20
2.	Justificativa.....	23
3.	Objetivos	
3.1	Objetivo geral.....	24
3.2	Objetivos específicos.....	24
4.	Métodos	
4.1	Animais e coleta de material biológico.....	25
4.2	Validações do modelo de sepse empregado.....	27
4.3	Transcriptômica: métodos laboratoriais e análise dos resultados.....	29
5.	Resultados	
5.1	Tarefa de esquiva inibitória.....	31
5.2	Transcriptômica.....	32
6.	Discussão	
6.1	Efeitos da sepse que são independentes da idade.....	41
6.2	Efeitos da sepse que estão atrelados ao envelhecimento.....	43

7.	Conclusões.....	48
8.	Anexo.....	49
9.	Referências.....	50

Listas de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

β	Beta
$\leq$	Menor igual ou igual
$\geq$	Maior ou igual
$\pm$	Mais ou menos
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius
BASES	Brazilian Sepsis Epidemiological Study
BHE	Barreira Hematoencefálica
BMP	Proteína Óssea Morfogênica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLP	Perfuração Cecal
cm	Centrímetros
Cobea	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAMP	Padrões Moleculares Associados ao Dabo Celular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Hb	Hemoglobina livre
Hp	Gene da Haptoglobina
kg	Kilograma
LPS	Lipopolissacarídeos
mg	Miligrama
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MRP	Myeloid-related protein
NF-kB	Nuclear factor kappaB
NGF	Fator de Crescimento de Nervos
OCV	Órgãos Circunventriculares
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PGE2	Prostaglandina E2
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões Moleculares
qSOFA	Quick SOFA
RNA	Ácido Ribonucleico
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SNC	Sistema Nervoso Central
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UPases	Uridinas Fosforilases
UPP1	Uridina Phosphorylase 1
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

Listas de Figuras

Figura 1	Representação das vias de comunicação entre o sistema imunológico e o sistema nervoso.....	18
Figura 2	Aparelho utilizado para o treino e o teste na tarefa de esquiva inibitória.....	29
Figura 3	Efeito da sepse sobre a capacidade de retenção de memória e de aprendizagem em ratos jovens.....	32
Figura 4	Investigação dos mRNAs diferencialmente expressos. (A) análise de componentes principais. (B,C e D) Análise da clusterização hierárquica da expressão de mRNA, respectivamente, no hipocampo, no córtex pré-frontal e em amostras do cerebelo.....	34
Figura 5	Diagrama de Venn representando a quantidade de genes diferencialmente expressos em cada região encefálica avaliada dos grupos de animais jovens.....	35
Figura 6	Diagrama de Venn representando a quantidade de genes diferencialmente expressos em cada região encefálica avaliada dos grupos de animais idosos.....	39
Figura 7	Considerando um fold change ≥ 1 e ≤ -1 para os genes com a expressão semelhante nas 3 regiões após a infecção, 40 genes apresentaram a expressão diminuída (em vermelho) e 11 genes apresentaram a expressão aumentada (em verde) na comparação entre os grupos de animais jovens (sham YG vs. sepsis YG). Ademais, na comparação entre os grupos animais idosos (sham AG vs. sepsis AG) encontramos apenas 4 genes com a expressão diminuída (em vermelho) e 1 gene com a expressão aumentada (em verde).....	40

Lista de Tabelas

Tabela 1	Detalhamento dos genes diferencialmente expressos entre os grupos de animais jovens.....	36
Tabela 2	Detalhamento dos genes diferencialmente expressos entre os grupos de animais idosos.....	40

Resumo

Hamasaki MY. *Análise transcriptômica em estruturas encefálicas de ratos jovens e idosos submetidos ao modelo de ligadura e perfuração cecal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Dentre as manifestações clínicas observadas em pacientes sépticos, as disfunções neurológicas são, provavelmente, as de fisiopatologia mais obscura e pobremente explorada, o que consequentemente as torna de difícil entendimento e tratamento médico. Adicionalmente, estudos epidemiológicos indicam que a síndrome séptica é mais frequente e mais letal em pacientes idosos. Nesse contexto, este trabalho objetivou comparar os efeitos da sepse, induzida pelo modelo de ligadura e perfuração cecal, no encéfalo de ratos jovens e idosos por meio da análise da expressão gênica de larga escala (transcriptoma), a fim de averiguar como as alterações no padrão de expressão podem estar relacionadas a disfunções neurológicas. Os resultados deste estudo indicaram a diminuição da expressão dos genes Bcl-3, S100A8 e uridina fosforilase 1, bem como o aumento da expressão de Stefin A3, sendo tais efeitos característicos das manifestações comuns da sepse no sistema nervoso central, independentemente da idade dos animais; por outro lado, a diminuição da expressão do gene da haptoglobina foi observada apenas nos animais idosos com sepse. De forma geral, na comparação entre animais idosos e jovens, os resultados desta pesquisa apontaram que animais idosos apresentam uma quantidade menor de genes modificados pela sepse, o que sugere menor capacidade de ativar mecanismos neuroprotetores.

Descritores: 1.sepse 2.encefalopatia associada a sepse 3.envelhecimento 4.perfilação da expressão 5.gênica transcriptoma 6.hipocampo 7.cerebelo 8.córtex pré-frontal

Abstract

Hamasaki MY. *Transcriptomic analysis of encephalic structures of young and aging rats submitted to the model of cecal ligation and puncture* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Among the clinical manifestations observed in septic patients, the neurological dysfunctions are probably the most obscure and poorly explored pathophysiology, which consequently makes them difficult to understand and to treat. Additionally, epidemiological studies indicate that septic syndrome is more frequent and more lethal in elderly patients. In this context, this article is aimed at comparing the effects of sepsis, induced by the ligature model and cecal perforation, on the brain of young and elderly rats by means of the analysis of the large scale gene expression (transcriptome), in order to investigate how the changes in this expression may be related to neurological dysfunctions. The results of this study indicated decreased expression of the Bcl-3, S100A8 and uridine phosphorylase 1 genes, as well as increased expression of Stefin A3, these effects being characteristic of the common manifestations of central nervous system sepsis regardless of the age of the animals; on the other hand, decreased haptoglobin gene expression was observed only in the elderly animals with sepsis. In general, in the comparison between old and young animals, the results of this research indicated that elderly animals present a smaller amount of genes modified by sepsis, which suggests a smaller capacity to activate neuroprotective mechanisms.

Descriptors: 1.sepsis 2.sepsis-associated encephalopathy 3.aging 4.gene expression profiling 5.transcriptome 6.hippocampus 7.cerebellum 8.prefrontal cortex

1. Introdução

1.1 Seps

1.1.1 Conceitos básicos

A doença infecciosa (ou doença transmissível) é definida como uma infecção causada por um agente infeccioso específico ou por seus produtos tóxicos que resultam na transmissão desse agente ou produtos de um indivíduo, animal ou reservatório infectado para um hospedeiro suscetível (Barreto et al., 2006). A seps é uma doença infecciosa de etiologia variada (bactérias, vírus, fungos ou até mesmo protozoários), caracterizada por uma síndrome sistêmica complexa e relativamente pouco compreendida.

Os agentes infecciosos que penetram no organismo podem provocar danos através de dois mecanismos básicos: pela invasão direta e prejudicial dos tecidos e/ou pela produção de substâncias tóxicas. A capacidade de um microrganismo produzir toxinas é um fator importante na via patogênica de algumas doenças. As toxinas bacterianas são usualmente divididas em exotoxinas e endotoxinas (Salles et al., 1999).

Na infecção, determinados patógenos utilizam-se de proteínas que modulam extracelularmente funções relacionadas à interface entre o patógeno e o hospedeiro. Em alguns casos, estas moléculas podem ocasionar danos diretos às células alvo, embora na maior parte das vezes, ocorra apenas uma regulação das funções celulares, a fim de criar no hospedeiro um ambiente mais apropriado para a sobrevivência e replicação do microrganismo invasor. Estas moléculas são geralmente denominadas de exotoxinas (Spanò e Galán, 2009).

Por outro lado, as endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) constituintes da membrana celular de bactérias gram-negativas, e que podem ser liberadas na corrente circulatória após a morte ou lise destas bactérias. Frequentemente estas toxinas produzem um estado patológico no homem e em animais de experimentação (Thomas, 1954; Morrison, Ulevitch, 1978).

Embora a sepse seja inicialmente provocada por processo infeccioso, para que seja realizado o diagnóstico da doença torna-se necessária uma manifestação do hospedeiro a nível sistêmico. Por este motivo, os critérios de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) – taquicardia, alteração da temperatura, taquipneia e alteração do leucograma – foram descritos há mais de três décadas como sendo expressão clínica da resposta do hospedeiro à inflamação.

Neste contexto, na presença de dois ou mais dos critérios de SIRS, considerava-se que a infecção evoluía para sepse, sepse grave e choque séptico, de acordo com aumento da gravidade da doença. Essa abordagem foi referendada pela declaração de consenso do *American College of Chest Physicians* e da *Society of Critical Care Medicine*, em 1992, e foi (até 2016) uma estratégia predominante para classificar sepse tanto na prática assistencial quanto nos estudos clínicos (Bone et al., 1992).

Recentemente, a *Society of Critical Care Medicine* e a *European Society of Critical Care Medicine* promoveram uma nova conferência de consenso e publicaram as novas definições de sepse, conhecidas como Sepsis 3. Em resumo, a caracterização ampla de sepse pela nova publicação, foi definida pela “presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida secundária à resposta desregulada do organismo à infecção” (Singer et al., 2016a).

Deste modo, a presença dos critérios da SRIS deixou de ser necessária para o diagnóstico da sepse e foi substituída pela variação do escore *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA). Adicionalmente, o novo consenso sugeriu também o uso de um escore SOFA simplificado, denominado “quick SOFA” (qSOFA). Trata-se de uma ferramenta a ser utilizada a beira do leito para identificar rapidamente pacientes adultos com maior probabilidade de ter desfechos clínicos desfavoráveis, se eles apresentarem infecção (Machado et al., 2016; Singer et al., 2016a).

1.1.2 Epidemiologia

Durante os últimos anos, sepse vem se tornando o principal tema discutido em distintos fóruns e revistas médicas. No entanto, o real impacto dessa doença na sociedade ainda é insuficientemente discutido. Uma das principais fontes de dados para solidificar essa questão, e mesmo propiciar às autoridades de saúde e aos profissionais uma melhor contextualização, são os estudos epidemiológicos (Silva et al., 2004b).

Ao longo de 2005 a 2015, estima-se que a incidência global de indivíduos hospitalizados por sepse foi de aproximadamente 437 casos a cada 100.000 pessoas ao ano. Esses dados equivalem a uma estimativa anual de 31,5 milhões de indivíduos diagnosticados com sepse e 19,4 milhões de casos de sepse grave tratados em hospitais em todo o mundo (Tillmann e Wunsch, 2018).

Estudos epidemiológicos indicaram que em 2009, a sepse foi a décima primeira maior causa de morte nos Estados Unidos. Mais de 750 000 casos de sepse são registrados a cada ano nos hospitais americanos, sendo que

mais da metade dos casos está associada ao desenvolvimento de choque séptico, resultando em 215 000 mortes. A incidência de sepse pode ser comparada ao número de casos de ataque cardíaco (875 000) ou acidente vascular cerebral (700 000), e a mortalidade anual também se aproxima de infarto agudo do miocárdio (221 000) e acidentes vasculares encefálicos (273 000) (Angus et al., 2001; Thom et al., 2006; Kochanek et al., 2011).

Os dados brasileiros já publicados são antigos e se referem a três estudos multicêntricos. O primeiro, denominado BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*), foi conduzido em cinco unidades de terapia intensiva, de maio de 2001 a janeiro de 2002, e indicou que a letalidade por sepse grave e choque séptico foi de 47,3% e 52,2%, respectivamente (Silva et al., 2004a). O estudo Sepse Brasil de 2003, abrangendo 75 UTIs de 17 estados brasileiros, mostrou uma taxa de mortalidade para sepse grave e choque séptico de 34,4% e 65,3%, respectivamente (Salles et al., 2006). Um estudo multicêntrico, prospectivo, randomizado para avaliação do custo de pacientes sépticos, com dados colhidos entre 2003 e 2004 em 21 UTIs brasileiras, mostrou um dado de alta relevância: uma letalidade maior em hospitais ligados ao Sistema Único de Saúde (SUS) (49,1%) em relação àqueles do Sistema de Saúde Suplementar (36,7%) (Sogayar et al., 2008).

Estima-se que nos Estados Unidos da América, o custo anual para o tratamento da sepse ultrapassa 16 bilhões de dólares (Angus et al., 2001). Ainda, segundo dados do estudo BASES, o quadro relacionado ao custo da sepse no Brasil não é muito diferente, mostrando que a sepse consiste na principal geradora de custos, nos setores público e privado. Os custos relacionam-se à necessidade de utilização de equipamentos sofisticados, medicamentos e

intenso trabalho multiprofissional, como enfermeiros, fisioterapeutas, nutrólogos, farmacêuticos e médicos. Dados de 2003 referentes às internações em UTIs indicaram que pacientes diagnosticados com a síndrome séptica representaram 25% da ocupação total de leitos (Silva et al., 2004a).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2010 as infecções e consequentemente a síndrome séptica representaram a maior causa mundial de óbitos neonatais representando aproximadamente 36% do total das mortes. Entretanto, apesar de constituir uma causa importante de letalidade na faixa etária de indivíduos neonatos, a síndrome séptica é mais frequente e fatal em pacientes idosos, onde a taxa de mortalidade apresenta índices em torno de 70% (Martin et al., 2003; Rangel-frausto, 2005; OMS, 2011). Além da idade, estudos indicam que etnia e gênero constituem fatores importantes no desenvolvimento e nas complicações relacionadas a sepse. Indivíduos afrodescendentes e pertencentes ao sexo masculino são mais susceptíveis à doença (Angus et al., 2001; Mayr et al., 2010).

Os pulmões constituem o local mais comum de infecção, seguidos pelo abdome e trato urinário (Tillmann, Wunsch, 2018). Em 20 a 30% dos pacientes, o sítio de infecção não é determinado e mesmo nos casos onde há uma suspeita, algumas vezes as culturas permanecem estéreis e os resultados dos estudos microbiológicos tornam-se questionáveis. As hemoculturas positivas são encontradas em apenas 30% dos casos. Infecções pleurais, pericárdicas e em seios paranasais podem passar facilmente despercebidas (Wheeler, Bernard, 1999).

Dentre os agentes infecciosos geradores da sepse, as bacterianas são comumente encontradas em hemoculturas. *Staphylococcus aureus* e

Streptococcus pneumoniae são os gram-positivos mais frequentemente isolados, enquanto que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* predominam entre os gram-negativos isolados (Opal et al., 2003; Ranieri et al., 2012).

1.1.3 Conceitos gerais da fisiopatologia da sepse

1.1.3.1 Sistema imunológico e sepse

A cascata imune está relacionada ao reconhecimento de um antígeno, e a elaboração de uma resposta direcionada ao mesmo, a fim de eliminá-lo do organismo. O sistema imune inato consiste na primeira linha de defesa do organismo contra patógenos e lesões teciduais (Akira et al., 2006). Durante um longo período, a imunidade inata foi considerada uma resposta inespecífica, caracterizada pela internalização e digestão de microrganismos e substâncias por macrófagos e leucócitos. Entretanto, a imunidade inata possui especificidade considerável, uma vez que é capaz de distinguir moléculas próprias de moléculas patogênicas, um processo que envolve receptores responsáveis por reconhecer estruturas microbianas altamente conservadas. Estes receptores são denominados de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) (Janeway, 1992).

1.1.3.2 Receptores de Reconhecimento de padrões moleculares

Até o presente momento, quatro diferentes famílias de PRRs já foram identificadas. Estas incluem as proteínas de membranas como receptores do tipo Toll e receptores de lectina tipo C, bem como proteínas citoplasmáticas tipo NOD

e receptores do tipo ácido retinóico gene induzível-1 (Kumagai e Akira, 2010). As manifestações da sepse dependem da resposta do hospedeiro e das características do organismo infectante. Os PRRs são responsáveis pela detecção dos microrganismos e pelo reconhecimento de estruturas conservadas entre espécies microbianas denominadas de padrões moleculares associadas aos patógenos (PAMPs, do inglês: pathogen associated molecular patterns) (Takeuchi e Akira, 2010).

Os PAMPs incluem lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, peptideoglicanos, flagelina e outros. Partes das moléculas produzidas por mamíferos assim como os PAMPs também se ligam aos PRRs. Tais moléculas são denominadas DAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Dano Celular) ou alarminas e podem ser produzidas não somente via infecções, mas também por meio de traumas, danos isquêmicos ou choques hemorrágicos. Tanto DAMPs quanto PAMPs ao se ligarem aos PRRs, durante a infecção ou dano tecidual, induzem uma cascata que culmina na expressão de interferons do tipo I, citocinas inflamatórias e quimiocinas.

As citocinas produzidas após ativação pelos PAMPs e DAMPs, consistem em fatores determinantes no que se refere ao controle da ativação da resposta imune adaptativa, ou seja, na conversão de um linfócito em Th1 ou Th2. Infecções ocasionadas por microrganismos intracelulares induzem, geralmente, a diferenciação celular para Th1, enquanto infecções helmínticas induzem a diferenciação para Th2. Foi verificado que LPS de *E. Coli* induz resposta Th1 *in vivo* (Akira et al., 2001; Schnare et al., 2001).

Embora a resposta inflamatória intensa continue a ser considerada como um mecanismo importante na fisiopatologia da sepse, é evidente que a

abolição dos fenômenos pró-inflamatórios, não é uma forma eficaz de tratamento, que resulta em respostas altamente deletérias, uma vez que níveis mínimos são necessários para o combate a uma infecção. (Eskandari et al., 1992).

1.1.2 Conceitos específicos da fisiopatologia da sepse

1.1.2.1 Transcriptômica em Sepses

A transcriptômica é uma poderosa técnica que pode ser utilizada para detecção de novo alvos terapêuticos e biomarcadores no campo das doenças infecciosas (Christie, 2005; Chaussabel et al., 2010). Diversos estudos de expressão genica em larga escala já foram realizados em sepse, revelando repressão persistente de genes da imunidade adaptativa e ativação maciça de vias da imunidade inata em choque séptico (Wong et al., 2009). Utilizando RNA obtido de sangue total, Wong e colaboradores (2010) identificaram ativação da fosforilação oxidativa, sinalização por IL-10, receptores Toll-like, TREM, NF- κ B, via de ubiquitinação de proteínas e IL-6 em macrófagos. Tais autores também descreveram repressão de vias específicas de linfócitos T e sinalização por quimiocinas (CCR5). De maneira similar, Cvijanovich e colaboradores (2008) detectaram ativação de TLRs, IL-10, IL-6 e NF- κ B com repressão concomitante de linfócitos T. Além disso, detectaram ativação de proteínas de fase aguda, p38, sistema complemento e alguns receptores nucleares (LXR e PPAR) em associação a repressão de vias de apresentação antigênica.

Usando RNA de sangue total de pacientes sépticos, experimentos de expressão genica global realizados por Shanley e colaboradores (2007) concordam em vários aspectos com os estudos descritos acima, apesar de terem

sido únicos ao identificar ativação de integrinas, IGF-1, GM-CSF e receptor de insulina. Caminhando no mesmo sentido, Tang e colaboradores (2009) descreveram ativação de genes de apoptose, incluindo *CARD12*, *APAF1* e *ELMOD2* em células mononucleares de pacientes sépticos.

Um estudo utilizando pacientes com trauma fechado grave, descreveu resultados surpreendentemente semelhantes, com ativação de grande número de genes envolvidos em inflamação, reconhecimento de padrões e funções antimicrobianas e repressão simultânea de genes envolvidos em apresentação antigênica e proliferação de células T, sugerindo que estresse fisiológico intenso independente da causa, apresentaria assinaturas genicas semelhantes (Xiao et al., 2011).

1.1.2.2 Heterogeneidade da sepse

Sepse afeta diferentes grupos de pacientes (idosos, diabéticos, nefropatas, indivíduos politraumatizados, cirúrgicos, obesos, etc.). Historicamente, tem sido aceito que cada grupo específico de pacientes apresentaria uma resposta inflamatória característica. No curso da sepse, ademais, a transição da resposta inflamatória para um padrão de imunossupressão foi sugerido para explicar os resultados desapontadores, obtidos pelos estudos clínicos que investigaram o uso de drogas anti-inflamatórias nesta população de doentes (Bone, 1996; Bone et al., 1997) As análises transcriptômicas em larga escala estão provendo informações interessantes neste sentido, demonstrando que grupos específicos de pacientes realmente apresentam perfis singulares (Maslove et al., 2012; Maslove e Wong, 2014; Severino et al., 2014). No entanto, uma revisão sistemática publicada

recentemente foi incapaz de detectar fases pro-inflamatórias e anti-inflamatórias distintas em sepse ou diferenças de expressão genica ao analisar diferentes subpopulações (Tang et al., 2010). O assunto, portanto, permanece extremamente controverso.

Nosso grupo de pesquisa, até onde sabemos, foi o primeiro a estudar características do idoso em sepse, através de análise transcriptômica em larga escala (Pellegrina et al., 2015). Detectamos 388 genes diferencialmente expressos entre indivíduos idosos e jovens em sepse e 442 entre indivíduos idosos e jovens saudáveis.

De maneira interessante, vias de fosforilação oxidativa e disfunções mitocondriais foram as mais alteradas no idoso em sepse, quando comparado a pacientes jovens com sepse. Outras vias relevantes foram as de sinalização por TGF- β , Wnt/ β -catenina, cálcio, assim como vias menos estudadas nesta doença, tais como NGF (fator de crescimento de nervos) e BMP (proteína óssea morfogênica).

Inicialmente, nossos resultados confirmaram que naquilo que se refere à produção de TNF α , IL-6, IL-1 β , TLRs e outros marcadores clássicos de ativação celular, jovens e idosos respondem de maneira semelhante a um insulto infeccioso grave. Algumas outras vias, conforme descrito acima, parecem estar mais afetadas no paciente idoso em estado crítico, do que no jovem. Nossa opinião é que defeitos de função mitocondrial e fosforilação oxidativa, TGF- β , Wnt/ β -catenina, BMP, NGF e na sinalização por cálcio são diferenciais e exclusivas do idoso em sepse.

Confirmando a nossa hipótese, nós observamos uma diminuição marcante na expressão de genes da cadeia respiratória mitocondrial no idoso

em sepse (Pellegrina et al., 2015). A disfunção mitocondrial contribui reconhecidamente para a falência de múltiplos órgãos em sepse. Fisiologicamente, pequenas quantidades de espécies reativas do oxigênio são produzidas pelos complexos I e III da cadeia respiratória. Sepse é caracterizada por um aumento no estresse oxidativo, devido a produção aumentada por neutrófilos, aumento na atividade da enzima xantina oxidase, aumento nos níveis plasmáticos de óxido nítrico e diminuição da capacidade antioxidante do plasma (Wendel e Heller, 2010).

Mediadores pro-inflamatórios e estresse oxidativo desregulam a função das enzimas da cadeia respiratória e levam a dano estrutural de lipídeos, proteínas e DNA mitocondriais (Garcia-Ruiz et al., 1997; Suliman et al., 2003), promovendo falência de múltiplos órgãos (Galley, 2011). Dano mitocondrial e disfunção secundária a estresse oxidativo também são característicos do processo de envelhecimento (Opal et al., 2005; Cannizzo et al., 2011; Floyd et al., 2011). Neste sentido, camundongos que apresentam defeito na função da enzima DNA polimerase mitocondrial exibem vida mais curta e diversos sinais de envelhecimento precoce, tais como alopecia, diminuição da atividade física e perda precoce da função reprodutiva (Trifunovic et al., 2004).

Os mecanismos que levam a disfunção específica de diversas vias de sinalização na resposta imune do idoso são complexos e envolvem múltiplos fatores. Nós propomos que fatores ambientais (Su et al., 2013; Muller e Pawelec, 2014), microRNAs (Harries, 2014) e alterações epigenéticas (Weidner e Wagner, 2014) devam ter um papel-chave na modulação das cascatas de resposta imune que são particularmente afetadas no paciente em idade avançada.

Nossos dados confirmam relatos prévios de que o envelhecimento é acompanhado de alterações na expressão genica de vias do sistema imune (de Magalhaes et al., 2009). Outro resultado importante foi revelar que subgrupos de RNAs longos não codificantes também estão desregulados em sepse e durante o processo de envelhecimento, o que torna claro a necessidade de estudos aprofundados neste sentido para se investigar o papel biológico exercido por esta classe de transcritos no choque séptico em indivíduos de idade avançada.

1.1.3 Sintomatologia da sepse

A sepse se manifesta classicamente por meio de sinais e sintomas inespecíficos, tais como febre ou leucocitose. Os sinais e parâmetros laboratoriais mais evidentes são geralmente tardios, e estão associados a disfunções orgânicas e a alta taxa de mortalidade. A resposta inflamatória intensa, somada aos mecanismos bacterianos e de outras células eucarióticas, constituem as causas das alterações decorrentes desta doença nos mais diversos órgãos e tecidos (Rosenberger e Finlay, 2003).

Diversos fatores como hipotensão, redução/deformidade das hemácias e trombose microvascular, contribuem para a diminuição do aporte de oxigênio no choque séptico. A inflamação pode ocasionar disfunção do endotélio vascular, acompanhada por morte celular e perda de integridade das barreiras naturais, dando origem a edemas subcutâneos. Adicionalmente, conforme descrito anteriormente, danos mitocondriais causados pelo estresse oxidativo e por diversas outras vias na sepse promovem morte celular e aumento da secreção de DAMPs para meio extracelular, que consequentemente ocasionam

lesões adicionais em diversos outros tecidos (Zhang et al., 2010; Galley, 2011; Goldenberg et al., 2011).

Apesar das diversas informações provenientes da pesquisa clínica e da pesquisa básica na sepse, o mecanismo exato pelo qual os pacientes vêm a óbito continua desconhecido. Necrópsias realizadas logo após a morte, em pacientes sépticos, não evidenciam lesões que justifiquem a morte ou que não pudessem ser amenizadas por tratamento de suporte. Na realidade, o que acontece na maioria das vezes, é que o paciente acaba morrendo inesperadamente por colapso cardiovascular ou choque refratário, ou ainda quando se decide por interromper a progressão dos esforços, habitualmente após um longo período de internação na UTI, quando o indivíduo já se encontra com insuficiência de múltiplos órgãos, sem expectativas de melhora ou qualidade de vida (Hotchkiss e Karl, 2003).

1.2 Encefalopatia associada à sepse

1.2.1 Aspectos gerais

Doenças que provocam inflamação aguda do SNC são provavelmente uma das causas mais comuns de óbito em unidades de terapia intensiva (UTIs), pois pacientes em estado crítico apresentam uma série de alterações relacionadas ao dano e à disfunção do SNC que complicam seu quadro clínico (Chaudhry e Duggal, 2014).

Clinicamente, indivíduos que apresentam neuroinflamação manifestam um amplo espectro de sintomas, que vai desde confusão mental até o coma. Entre as manifestações clínicas a mais comum observada nesses indivíduos é, indiscutivelmente, o *delirium* (Chaudhry e Duggal, 2014).

Também chamado de estado de confusão aguda, o *delirium* é uma condição sintomatológica que resulta em confusão mental e outras perturbações no pensamento e no comportamento, incluindo alterações na percepção, na atenção, no humor e no nível de atividade. Os mecanismos fisiopatológicos que acarretam o *delirium* não são totalmente compreendidos. Todavia, a interação e os efeitos dos diferentes mediadores inflamatórios sobre as células nervosas em distintas regiões do sistema nervoso central (SNC) podem justificar parcialmente a semelhança entre o quadro sintomatológico apresentado por indivíduos com *delirium* (Morandi et al., 2012).

No nível celular, o *delirium* resulta de alterações da atividade metabólica do cérebro e da ativação da micróglia, que evoluem para a desregulação da síntese de neurotransmissores, principalmente os do sistema colinérgico. Já do ponto de vista topográfico, estruturas do sistema límbico e regiões do córtex frontal são áreas mais vulneráveis ao insulto inflamatório (MacLullich et al., 2013; Stevens et al., 2013).

O *delirium* é uma condição extremamente comum em indivíduos idosos. Nos Estados Unidos, o *delirium* atinge entre 14 e 56% de todos os pacientes idosos hospitalizados (Inouye et al., 2014). O desenvolvimento do *delirium* depende de uma complexa interação de múltiplos fatores de risco. Entre os idosos, a demência é o principal fator de risco, estando presente em até $\frac{2}{3}$ de todos os casos de *delirium* (Inouye, 2006). Diversos trabalhos tentam justificar

que a origem do *delirium* no idoso se deva ao aumento da inflamação sistêmica e do estresse promovido por doenças agudas e aos efeitos adversos de alguns fármacos (Godbout e Johnson, 2009; Simone e Tan, 2011).

Diversos modelos animais são utilizados para compreender a estreita relação entre os mediadores inflamatórios e as alterações cognitivas. Atualmente, modelos de sepse grave (e, conseqüentemente, de inflamação sistêmica), como a administração de LPS e a ligadura e a perfuração cecal (CLP), são amplamente utilizados e induzem alterações cognitivas próximas às observadas em humanos (Semmler et al., 2008).

1.2.2 Interações entre o sistema imunológico e o sistema nervoso

Evidências indicam que a inflamação sistêmica aguda pode se propagar para o SNC induzindo diversas alterações nas funções encefálicas. Para que ocorra essa propagação, deve haver, primeiramente, uma interface de comunicação entre o sistema imunológico e o SNC. Neste sentido, existem pelo menos quatro interfaces através das quais a inflamação sistêmica pode ser reconhecida pelo sistema nervoso (Perry, 2004).

A primeira via, e a mais simples delas, envolve os órgãos circunventriculares (OCVs), que estão localizados próximos aos núcleos neuroendócrinos e neurovegetativos. Os OCVs são estruturas destituídas de barreira hematoencefálica (BHE) eficaz, o que permite o contato direto de elementos presentes no sangue com o tecido encefálico. Dessa maneira, mediadores inflamatórios presentes no plasma sanguíneo de indivíduos acometidos por diversas patologias podem facilmente penetrar e interagir com receptores presentes em neurônios e células da glia, promovendo uma cascata

de eventos que culminam na propagação da inflamação para o SNC (Perry, 2004).

A segunda via envolve os receptores celulares presentes em componentes do sistema nervoso periférico. Vias nervosas periféricas, como o nervo vago e o trigêmeo, têm a capacidade de detectar a inflamação visceral por causa da presença de receptores PRRs e de citocinas em seus axônios. Interessantemente, a interação entre os neurônios periféricos e o sistema imunológico aparenta ser bidirecional (Borovikova et al., 2000; Mihaylova et al., 2012). Em 2000, Borovikova et al. descreveram que o SNC, através do nervo vago, pode modular o nível circulante de fator de necrose tumoral (TNF). Esse mecanismo baseia-se na liberação de acetilcolina, principal neurotransmissor dos neurônios do nervo vago, que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias nas células imunológicas.

A terceira via de comunicação entre a inflamação sistêmica e o SNC se dá em virtude da interação de algumas citocinas com as barreiras encefálicas. Antigamente, essas barreiras eram conceituadas como sendo dispositivos que impediam ou dificultavam a troca de substâncias entre o sangue e o tecido nervoso, entre o sangue e o liquor e entre este e o tecido nervoso (Machado, 2006). Nas últimas décadas, o ponto de vista sobre o papel das barreiras mudou drasticamente (Romanovsky, 2005).

Hoje, é amplamente aceito que as barreiras encefálicas atuam como transdutores de sinais, pois sua interação com diferentes substâncias periféricas induz modificações específicas nas células nervosas. A administração periférica de LPS, IL-1beta ou TNF-alfa tem demonstrado induzir rapidamente a expressão de enzimas de síntese de prostaglandina E2 (PGE2) no endotélio vascular e de

células perivasculares por todo o cérebro. O parênquima cerebral é predominantemente desprovido de enzimas que catabolizam PGE₂, permitindo, dessa forma, sua livre circulação e facilitando a sua interação com receptores de componentes do SNC responsáveis pelo controle da temperatura corporal. A interação de PGE₂ com estruturas nervosas responsáveis pela termorregulação corporal é uma das vias que justifica o quadro de hipertermia geralmente encontrado em pacientes acometidos por inflamação sistêmica (Ek et al., 2001; Yamagata et al., 2001; Romanovsky et al., 2005).

A última via de comunicação entre o sistema nervoso e a inflamação sistêmica descrita na literatura também envolve as barreiras encefálicas. Evidências indicam que essas barreiras transportam citocinas diretamente para o tecido encefálico. No entanto, esse transporte é um evento complexo, pois nem todas as citocinas são transportadas e as quantidades conduzidas variam entre os diferentes tipos de citocinas e entre as regiões do cérebro, conforme as circunstâncias patofisiológicas apresentadas pelo indivíduo (Banks e Erickson, 2010). A figura 1 representa uma síntese das vias de interação entre o sistema imunológico e o sistema nervoso.

Figura 1 - Representação das vias de comunicação entre o sistema imunológico e o sistema nervoso

1.2.3 Efeitos da inflamação sobre o SNC

As citocinas são basicamente conhecidas como mensageiros químicos entre células do sistema imunológico e desempenham um papel crucial na mediação de respostas inflamatórias. Durante as últimas décadas, diversos trabalhos têm demonstrado os efeitos das citocinas sobre as células do SNC, o inverso também tem sido extensamente relatado, visto que o sistema nervoso é capaz de influenciar em processos imunológicos (Wrona, 2006).

Conforme descrito anteriormente, quatro possíveis vias estão envolvidas no reconhecimento, pelo SNC, da inflamação sistêmica (ver tópico 1.2.2). Metade dessas vias proporcionam a interação das células nervosas com as citocinas produzidas pelas células imunológicas. Mediadores inflamatórios, como as citocinas, em contato com as células nervosas são capazes de alterar o metabolismo celular, induzindo o estresse oxidativo e as disfunções mitocondriais, o que ocasiona anormalidades patológicas que variam desde alterações da neurotransmissão até a morte celular por apoptose (Messaris et al., 2004; Sonnevile et al., 2013).

Entre as diferentes citocinas, o estudo dos efeitos da IL-1 sobre as células nervosas compõe a maior parte dos artigos publicados. Níveis de IL-1 são indetectáveis no SNC de indivíduos saudáveis, entretanto tornam-se facilmente mensuráveis em condições patológicas. Todos os efeitos relatados das IL-1 (IL-1 α e IL-1 β) no sistema nervoso ocorrem por meio da sua interação com receptores IL-1 do tipo I (IL-1R1). De modo geral, estudos em roedores constataram que os IL-1R1 são expressos em todo o cérebro, com níveis particularmente maiores em áreas do hipocampo e do hipotálamo (Allan et al., 2005).

A ligação das IL-1 aos IL-1R1 encontrados nas células hipotalâmicas promove um quadro sintomatológico típico apresentado por pacientes com neuroinflamação. Nesse quadro, os pacientes apresentam alterações do apetite, da temperatura corporal e dos ciclos de sono/vigília. No hipocampo, essa mesma combinação (IL-1/IL-1R1) induz os efeitos prejudiciais ao funcionamento da memória (Allan et al., 2005; Shaftel et al., 2008).

A expressão de mediadores inflamatórios não é uma atividade exclusiva das células do sistema imunológico. Neurônios e células da glia (principalmente a micróglia) também são capazes de produzir seus próprios mediadores inflamatórios. A interação de PAMPs ou DAMPs com PRRs presentes em células nervosas constitui a principal via que promove a síntese de mediadores inflamatórios pelo SNC (Kigerl et al., 2014).

Independentemente da via por onde os mediadores inflamatórios entram em contato com o SNC, sabe-se que essa relação promove o aumento da permeabilidade da BHE, facilitando a migração de linfócitos e de mais mediadores inflamatórios para o SNC (Abbott, 2000).

Além do aumento da permeabilidade da BHE, o estresse hiperglicemiante, que geralmente se desenvolve em pacientes com inflamação sistêmica, também pode agravar os danos cerebrais em indivíduos com neuroinflamação. Isso ocorre porque os pacientes com hiperglicemia não controlada apresentam aumento da ativação da micróglia, redução importante da quantidade e da ativação de astrócitos, aumento do dano neuronal e apoptose no hipocampo e no córtex pré-frontal (Collier et al., 2008; Sonnevile et al., 2013).

1.2.4 Efeitos da sepse no SNC de idosos: um viés na literatura científica

Conforme descrito anteriormente, a sepse pode afetar pessoas de todas as idades. Não obstante, indivíduos em fase neonatal e aqueles que já têm um problema de saúde crônico, ou um sistema imunológico comprometido, apresentam um maior risco de desenvolver a doença (Mayr et al., 2014). Sabe-se, também, que os idosos compõem o grupo que apresenta maior vulnerabilidade à sepse. Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que mais de 65% das pessoas que desenvolvem sepse grave têm idade igual ou superior a 65 anos (Pisani, 2009; Umberger et al., 2015). Ademais, nos últimos 40 anos, a incidência da sepse tem aumentado substancialmente, o que pode ser justificado, em parte, pelo aumento da expectativa de vida da população mundial.

Recentemente, a definição de sepse 3.0 enfatizou que a doença se desenvolve necessariamente por meio de uma disfunção orgânica (Singer et al., 2016a). No SNC, sinais e sintomas ligados à disfunção são encontrados em aproximadamente $\frac{1}{3}$ de todos os pacientes que desenvolvem sepse (Heming et al., 2017). Conforme citado anteriormente (ver tópico 1.2.1), vale destacar que indivíduos com distúrbios encefálicos ligados à sepse podem apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas. Além disso, de acordo com Gotz e colaboradores (2014), ao menos 20% dos indivíduos que apresentaram sepse ficaram com algum tipo de sequela, tais como deficiências físicas e cognitivas, distúrbios do humor e baixa qualidade de vida.

Devido à nítida importância e à urgência em entender os mecanismos pelos quais a sepse induz modificações no funcionamento do SNC, observou-se, nos últimos anos, um aumento do número de artigos científicos publicados envolvendo o tema (Volpe et al., 2015; Mazeraud et al., 2016; Hamasaki et al., 2017). Estudos recentes que utilizaram técnicas de análise de expressão genica

em larga escala, no encéfalo de modelos animais de sepse, permitiram reconhecer algumas das vias neurológicas que são afetadas em um curto e longo período após a aquisição da doença (Singer et al., 2016b; Sun et al., 2017). De maneira sucinta, três processos principais estão envolvidos na fisiopatologia da encefalopatia séptica: neuroinflamação difusa, processos isquêmicos e excitotoxicidade (Chaudhry e Dugal, 2014; Mazeraud et al., 2016; Heming et al., 2017).

Embora novas tecnologias tenham permitido avanços nas descobertas científicas relacionadas às vias neurológicas afetadas pela sepse, nenhum estudo publicado até o momento utilizou modelos animais idosos. Todavia (conforme descrito no tópico 1.1.4.2), os indivíduos idosos, além de serem mais acometidos pela sepse, apresentam também uma resposta sistêmica diferenciada durante o curso da doença, quando comparados aos indivíduos jovens com sepse (Pellegrina et al., 2015; Nasa et al., 2012).

2. Justificativa

Dentre as manifestações clínicas, observadas em pacientes sépticos, as disfunções neurológicas são, talvez, as de fisiopatologia mais obscura e pobremente explorada, o que as tornam consequentemente de difícil tratamento e entendimento médico. Adicionalmente, estudos epidemiológicos indicam que a síndrome séptica é mais frequente e mais letal em pacientes idosos. Nesse contexto, a análise da expressão gênica de larga escala em diferentes regiões do encéfalo de ratos submetido a modelos de sepse é de extrema importância no que se refere ao maior entendimento da fisiopatologia da doença. Com intuito de esclarecer os dados epidemiológicos supracitados este trabalho buscou explorar resultados obtidos a partir do material biológico de animais jovens e idosos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Com o intuito de compreender a razão pela qual os indivíduos idosos são mais sensíveis aos efeitos deletérios da encefalopatia de origem séptica, objetivamos comparar as diferenças entre o padrão global de expressão gênica do encéfalo de animais jovens e idosos submetidos ao modelo de sepse.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as semelhanças e as diferenças na expressão de cada área encefálica coletada (córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo) entre os grupos de animais jovens e idosos.
- Realizar a busca de possíveis biomarcadores da encefalopatia séptica que são independentes da idade dos animais.
- Realizar a busca de possíveis biomarcadores da encefalopatia séptica que são dependentes da idade dos animais.
- Identificar as principais vias fisiopatológicas da encefalopatia associada a sepse que são passíveis de intervenções por meio de métodos terapêuticos.

4. Métodos

4.1 Animais e coleta de material biológico

Para realização deste estudo, foram utilizados ratos albinos machos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), os quais foram mantidos no Biotério de Experimentação da Disciplina de Reumatologia – Departamento de Clínica Médica, em condições de temperatura constante ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas (início do claro às 7:00 h) e com alimento (ração) e água “*ad libidum*”. O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP (Anexo A). Os experimentos obedeceram às normas e princípios do Internacional Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Society for Neuroscience, 1991) e do Cobeia (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991).

Esses animais foram divididos em dois grupos distintos: o grupo experimental (*sepsis*) e o grupo controle (*sham*). A fim de verificar as diferentes respostas entre as faixas etárias após a indução da sepse, o grupo experimental foi dividido da seguinte maneira: um subgrupo composto por ratos jovens com aproximadamente 2 meses de idade e 250 a 350 gramas (denominado *sepsis* YG) e o outro formado por animais idosos com aproximadamente 18 meses de idade e 650 a 900 gramas (denominado *sepsis* AG).

Nestes dois subgrupos, a sepse foi induzida pelo modelo de CLP. Primeiramente, os animais receberam anestesia intraperitoneal com Ketamina® (Cristália, São Paulo, Brasil), na dose de 80 mg/kg de peso do animal, e Xilazina® (Cristália), na dose de 10 mg/kg de peso do animal. Em seguida, os

animais foram submetidos à laparotomia com incisão de aproximadamente 2 cm em linha mediana, o suficiente para exteriorizar o ceco.

Posteriormente, as fezes ascendentes do cólon foram impelidas por compressão manual para dentro do ceco, a fim de encher ao máximo esta cavidade. Com fio de algodão 3.0, foi feita uma ligadura cecal firme, sem causar obstrução intestinal; na sequência, foram realizadas três punções, distalmente à ligadura, com agulha de calibre 21 e o local foi comprimido para testar a patência das punções.

Por fim, o ceco foi devolvido para a cavidade abdominal, e o abdômen foi suturado por planos. Após o procedimento, os ratos foram mantidos em temperatura ambiente e receberam água e ração à vontade.

Como forma de garantir que os resultados obtidos sejam efeitos exclusivos da sepse, estabeleceu-se um grupo controle, o qual foi igualmente dividido em animais jovens (*sham* YG) e animais idosos (*sham* AG). Nestes subgrupos, após o mesmo procedimento anestésico adotado no grupo experimental, os animais foram submetidos apenas à laparotomia com incisão de aproximadamente 2 cm em linha mediana, o suficiente para exteriorizar o ceco e, em seguida, devolvê-lo para a cavidade abdominal dos animais.

Doze horas após os estímulos definidos para cada grupo, os animais foram levados para uma sala específica e acusticamente isolada, onde foram anestesiados e decapitados com guilhotina; em seguida, a calota craniana dos animais foi retirada cautelosamente para exposição do encéfalo. Os encéfalos foram então removidos, e as áreas de interesse (hipocampo, cerebelo e córtex pré-frontal) foram coletadas e dissecadas rapidamente sob microscópio cirúrgico.

No *sepsis* AG, extraíram-se 7 amostras de cerebelo, 6 de córtex pré-frontal e 7 de hipocampo; no *sepsis* YG, foram extraídas 7 amostras de cerebelo, 8 de córtex pré-frontal e 8 de hipocampo. No grupo controle, as amostras extraídas foram: no *sham* AG – 7 amostras de cerebelo, 6 de córtex pré-frontal e 5 de hipocampo; no *sham* YG – 8 amostras de cerebelo, 9 de córtex pré-frontal e 8 de hipocampo. Após essa coleta, os materiais biológicos foram mantidos imersos em reagente estabilizante RNAlater® (Qiagen, Venlo, Holanda), a fim de evitar a degradação do RNA pela ação das enzimas RNAses.

4.2 Validações do modelo de sepse empregado

Com o intuito de atestar se técnica e o modelo animal de sepse executados neste estudo eram eficazes em promover prejuízos na função do SNC, o comportamento de alguns animais foram avaliados através da tarefa de esquiva inibitória ou teste de *step-down*. Este teste envolve a aprendizagem de uma tarefa aversiva onde, na sessão de treino, o animal ao descer da plataforma, recebe choque de baixa intensidade. Na sessão de teste, que pode ocorrer em vários tempos pós-treino, o animal é exposto novamente àquele ambiente para avaliação da sua memória ao contexto.

Para avaliar o quanto o animal aprendeu durante a reexposição ao aparato, mede-se o tempo que o animal leva para descer da plataforma (latência de descida). Quanto mais tempo este permanece na plataforma, maior será a latência de descida (Izquierdo e Medina, 1997), indicando que ocorreu aprendizagem na relação entre o contexto e a ocorrência do choque (estímulo aversivo). Assim, este teste produz aprendizado a partir de uma única tentativa,

tornando-o ideal para o estudo de processos envolvidos na aprendizagem e na memória.

Submetemos dois grupos de animais jovens ao teste descrito acima, um dos grupos apresentavam 8 ratos submetidos ao modelo sepse e o outro foi composto por 8 animais controles. Aplicamos os estímulos definidos para cada grupo logo após a sessão de treino e, exatamente, 12 horas antes da sessão de teste. O tempo de latência de descida dos grupos de animais durante a sessão de teste foram comparados utilizando o método de Kruskal-Wallis e resultados que apresentaram um $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Devido à escassez e a dificuldade de obtenção das amostras biológicas, não utilizamos animais idosos para esta validação.

O aparelho utilizado para o treino e o teste na tarefa de esQUIVA inibitória, consisti em uma caixa de madeira (30 x 5,0 x 15 cm) com a parede frontal de vidro removível; possui o assoalho formado por barras paralelas de aço inoxidável, separadas 1,0 cm de distância. Sobre as barras, ao centro do aparelho, está fixada uma plataforma de madeira 5x5cm (Figura 2). O aparato é conectado a um painel que permite ao experimentador ter controle sobre a intensidade da estimulação elétrica, o qual o animal será submetido (Bernabeu et al., 1997).

Figura 2 - Aparelho utilizado para o treino e o teste na tarefa de esquiva inibitória

4.3 Transcriptômica: métodos laboratoriais e análise dos resultados

A extração do RNA total das áreas de interesse dos encéfalos foi realizada através do Qiasymphony RNA Kit® (Qiagen, Venlo, Holanda) com auxílio do equipamento QIAsymphony® (Qiagen), seguindo as instruções estabelecidas pelo fabricante. Os padrões de expressão gênica global foram analisados através de ensaios do tipo microarranjos de DNA, realizados com o SurePrint G3 Rat GE 8x60K Kit® (Agilent, Califórnia, EUA). Esses ensaios permitiram a análise da expressão do genoma completo da espécie *Rattus norvegicus*, com base nos dados compilados nos bancos de dados RefSeq, Ensembl, UniGene e GenBank.

Os procedimentos de marcação, hibridação e lavagens dos microarranjos foram feitos através do LowInput QuickAmp Labeling Kit Two-Color® (Agilent), seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, a fim de realizar a leitura da expressão de cada gene, os microarranjos foram escaneados

pelo equipamento SureScan® (Agilent), utilizando parâmetros recomendados pelo fabricante para esse tipo de microarranjo. A avaliação da qualidade dos experimentos, a normalização interna a partir dos controles negativos e positivos e a identificação dos genes expressos foram realizadas pelo *software* Feature Extraction® (Agilent).

A análise dos dados foi realizada através do *software* Genespring® (Agilent). Para a normalização da intensidade de fluorescência entre as lâminas onde as amostras foram colocadas e preparadas, utilizou-se a ferramenta Quantile Normalization® do Genespring, sendo incluídas nas análises apenas sondas identificadas como detectadas ou não detectadas em 100% de pelo menos uma das condições experimentais. A análise de componentes principais, uma análise não supervisionada, foi utilizada para a visualização das principais fontes de variação no conjunto de dados, já para a análise estatística foram utilizados os métodos Moderated t-Test e One-Way ANOVA, de acordo com as comparações desejadas entre os grupos.

Foram considerados como resultados estatisticamente significativos aqueles com $p < 0.05$ após a correção pelo critério *False Discovery Rate* (FDR), proposto por Benjamini Hochberg (Benjamini, 2010; Benjamini e Hochberg, 1995). A clusterização hierárquica foi realizada através do método *Hierarchical Clustering with Support* utilizando os genes diferencialmente expressos, com o intuito de promover uma melhor compreensão das semelhanças, bem como das diferenças, específicas entre as amostras de cada grupo estudado. Para a seleção desses genes, adotou-se $p \leq 0.01$, ajustado através do teste de Bonferroni (Chuang-Stein e Tong, 1995).

5. Resultados

5.1 Tarefa de esquiva inibitória

Os resultados obtidos evidenciam que os animais submetidos ao modelo de sepse que utilizamos neste trabalho, apresentaram uma latência de descida menor em comparação com os animais do grupo controle (Figura 3). Esses resultados indicam um prejuízo na capacidade de retenção da memória e da aprendizagem, no grupo de animais sépticos quando comparados aos animais do grupo controle.

Deste modo, é importante ressaltar que estes resultados garantem que a técnica de sepse realizada foi eficaz em promover prejuízos nas funções nervosas. Adicionalmente, confirmando os nossos achados, reconhecemos que a capacidade do modelo de CLP em produzir prejuízos no SNC é apoiado também por uma ampla quantidade de trabalhos publicados na literatura científica (Hamasaki et al., 2018)

Figura 3 - Efeito da sepse sobre a capacidade de retenção de memória e de aprendizagem em ratos jovens.

5.2 Transcriptômica

Antes de expor os resultados provenientes da transcriptômica, é importante destacar que o SNC apresenta grande complexidade celular, uma vez que células da glia se misturam a neurônios de diversos subtipos, por exemplo. Sendo assim, o padrão de expressão genética obtido nesta pesquisa reflete uma média de intensidade de todas as células da região estudada.

Além disso, neste estudo, não foram avaliados tipos celulares do SNC de forma independente. Procurou-se, em vez disso, separar regiões específicas do cérebro através da macrodissecção, a fim de obter pelo menos padrões de expressão relacionados a um conjunto de células mais ou menos homogêneo. Portanto, o cerebelo, o córtex pré-frontal e o hipocampo foram avaliados independentemente, em condições normais e em animais sépticos.

A análise de componentes principais indicou que as amostras se agrupavam principalmente de acordo com a região do cérebro, independentemente da condição experimental e, ainda, que as regiões do

hipocampo e córtex pré-frontal se assemelhavam entre si, ao passo que diferiam da região do cerebelo (Figura 4A), em termos de genes expressos.

Por sua vez, a análise da clusterização hierárquica dos genes diferencialmente expressos em resposta à sepse foi organizada por área encefálica acometida e está representada pelos *heat maps* na Figura 4B (cerebelo), 4C (hipocampo) e 4D (córtex pré-frontal).

Figura 4 - Investigação dos mRNAs diferencialmente expressos. (A) análise de componentes principais. (B,C e D) Análise da clusterização hierárquica da expressão de mRNA, respectivamente, no hipocampo, no córtex pré-frontal e em amostras do cerebelo

A comparação dos genes diferencialmente expressos entre os grupos de animais jovens (*sham* YG vs. *sepsis* YG) indicou, no subgrupo experimental, um total de 2.111 genes modificados no cerebelo, 1.804 no hipocampo e 1.163 no córtex pré-frontal. A quantidade dos genes alterados que são exclusivos de cada área encefálica estudada é de 1.519 no cerebelo, 1.195 no hipocampo e 604 no córtex pré-frontal (Figura 5). Ainda na comparação entre os subgrupos de animais jovens, 474 dos genes alterados são compartilhados entre o cerebelo e o hipocampo, 424 entre o cerebelo e o córtex pré-frontal e 341 entre o hipocampo e o córtex pré-frontal.

Figura 5 - Diagrama de Venn representando a quantidade de genes diferencialmente expressos em cada região encefálica avaliada dos grupos de animais jovens

Um total de 206 genes alterados apresentou expressão semelhante nas 3 regiões avaliadas após a infecção (Figura 5). Destes, apenas 51 apresentaram um *fold change* ≥ 1 ou ≤ -1 , sendo que 40 genes estavam com expressão diminuída e 11 genes com a expressão aumentada (Figura 7). A

Tabela 1 representa a descrição completa dos 51 genes com *fold change* ≥ 1 ou ≤ -1 .

Tabela 1 - Detalhamento dos genes diferencialmente expressos entre os grupos de animais jovens

Abreviação do Gene	Nome completo do Gene	Gene ID	Perfil de expressão	Log2fold change	Valor <i>p</i>
S100a8	S100 calcium binding protein A8	116547	diminuído	-2,912	1,32E-12
S100a9	S100 calcium binding protein A9	94195	diminuído	-2,278	1,64E-10
Tmem252	transmembrane protein 252	361744	diminuído	-2,197	1,23E-09
Lcn2	lipocalin 2	170496	diminuído	-2,091	4,91E-15
Amy1a	amylase, alpha 1 ^a	24203	diminuído	-1,985	1,68E-08
Cxcl2	C-X-C motif chemokine ligand 2	114105	diminuído	-1,667	4,09E-05
Ces1d	carboxylesterase 1D	113902	diminuído	-1,659	1,16E-04
Upp1	uridina fosforilase 1	289801	diminuído	-1,644	1,83E-13
Slpi	secretory leukocyte peptidase inhibitor	84386	diminuído	-1,563	5,46E-07
Marc1	mitochondrial amidoxime reducing component 1	690745	diminuído	-1,528	7,83E-06
Bcl3	B-cell CLL/lymphoma 3	680611	diminuído	-1,456	5,58E-08
Tgm2	transglutaminase 2	56083	diminuído	-1,443	2,56E-16
Mt1a	metallothionein 1	24567	diminuído	-1,425	7,93E-12
Mgst2	microsomal glutathione S-transferase 2	295037	diminuído	-1,413	1,42E-11
Apold1	apolipoprotein L domain containing 1	444983	diminuído	-1,402	1,48E-04
Arhgap8	Rho GTPase activating protein 8	300115	diminuído	-1,396	1,02E-04
Pla1a	phospholipase A1 member A	85311	diminuído	-1,395	4,56E-13
Lrg1	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	367455	diminuído	-1,381	1,80E-10
Adm	Adrenomedullin	25026	diminuído	-1,319	9,30E-11

Continua

Continuação

Acer2	alkaline ceramidase 2	313339	diminuído	-1,312	9,00E-11
RGD1311251	similar to RIKEN cDNA 4930550C14	315665	diminuído	-1,275	1,40E-05
Adamts1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	79252	diminuído	-1,275	1,57E-06
Map3k6	mitogen-activated protein kinase 6	313022	diminuído	-1,272	1,34E-04
Mt2A	metallothionein 2 ^a	689415	diminuído	-1,272	3,28E-13
Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	309526	diminuído	-1,234	7,95E-05
Pdk4	pyruvate dehydrogenase kinase 4	89813	diminuído	-1,223	5,35E-06
Sds	serine dehydratase	25044	diminuído	-1,221	4,41E-04
Sult1a1	sulfotransferase family 1A member 1	83783	diminuído	-1,211	7,70E-11
Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2	24450	diminuído	-1,172	7,19E-05
Trpv4	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4	66026	diminuído	-1,144	4,13E-04
Il1r2	interleukin 1 receptor type 2	117022	diminuído	-1,141	4,24E-07
Pnpla2	patatin-like phospholipase domain containing 2	361676	diminuído	-1,126	6,48E-16
Pou2f3	POU class 2 homeobox 3	116544	diminuído	-1,122	1,56E-06
Angpt2	angiopoietin 2	89805	diminuído	-1,120	7,86E-07
Tnfrsf26	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 26	361685	diminuído	-1,103	2,47E-05
Fn1	fibronectin 1	25661	diminuído	-1,071	5,20E-08
Scara5	scavenger receptor class A, member 5	305974	diminuído	-1,070	8,22E-05
Afp	alpha-fetoprotein	24177	diminuído	-1,045	9,24E-05
Pex11a	peroxisomal biogenesis factor 11 alpha	85249	diminuído	-1,030	2,42E-09
Mrps10	mitochondrial ribosomal protein S10	363187	diminuído	-1,005	2,19E-04
RT1-M2	RT1 class Ib, locus M2	24988	aumentado	1,006	1,82E-04

Continua

Continuação					
Gareml	GRB2 associated regulator of MAPK1 subtype 2	362801	aumentado	1,097	8,11E-05
Itm2a	integral membrane protein 2 ^a	317218	aumentado	1,107	1,49E-07
Cxcl10	C-X-C motif chemokine ligand 10	245920	aumentado	1,126	3,60E-04
LOC367746	similar to Spindlin-like protein 2 (SPIN-2)	367746	aumentado	1,155	2,26E-04
Slc38a5	solute carrier family 38, member 5	192208	aumentado	1,179	6,87E-08
Prom1	prominin 1	60357	aumentado	1,182	7,62E-08
StefinA3	stefin-3-like	100911790	aumentado	1,212	3,81E-04
Cpox	coproporphyrinogen oxidase	304024	aumentado	1,217	3,64E-04
Ascl3	achaete-scute family bHLH transcription factor 3	246301	aumentado	1,225	3,62E-04
Slc16a4	solute carrier family 16, member 4	295356	aumentado	1,457	1,06E-08

Com o intuito de se obter uma interpretação mais embasada dos 51 genes que apresentaram *fold change* ≥ 1 e ≤ -1 , foi utilizada a ferramenta Gene Ontology¹. Assim, entre os animais jovens, considerando as principais funções dos genes alterados pela sepse similarmente nas três áreas, verificou-se que as vias afetadas com maior significância são as de respostas ao lipopolissacarídeo (LPS) (GO:0032496) e as de regulação positiva do processo inflamatório (GO:0050729).

Entre os subgrupos de animais idosos (*sham* AG vs. *sepsis* AG), a comparação dos genes diferencialmente expressos indicou, no subgrupo experimental, um total de 694 genes modificados no cerebelo, 1.508 no hipocampo e 652 no córtex pré-frontal. A quantidade dos genes alterados que são exclusivos de cada área encefálica estudada é de 570 no cerebelo, 1.348 no

¹ Disponível em: <<http://www.geneontology.org/>>.

hipocampo e 514 no córtex pré-frontal. Ainda na comparação entre os subgrupos de animais idosos, 80 dos genes alterados são compartilhados entre o cerebelo e o hipocampo, 58 entre o cerebelo e o córtex pré-frontal e 94 entre o hipocampo e o córtex pré-frontal (Figura 6).

Figura 6 - Diagrama de Venn representando a quantidade de genes diferencialmente expressos em cada região encefálica avaliada dos grupos de animais idosos

Um total de 14 genes alterados apresentou expressão semelhante nas 3 regiões após a infecção (Figura 6). Destes, apenas 5 apresentaram *fold change* ≥ 1 ou ≤ -1 , sendo que 4 genes estavam com expressão diminuída e 1 gene estava com a expressão aumentada (Figura 7). A Tabela 2 representa a descrição completa dos 5 genes com *fold change* ≥ 1 ou ≤ -1 .

Figura 7 - Considerando um fold change ≥ 1 e ≤ -1 para os genes com a expressão semelhante nas 3 regiões após a infecção, 40 genes apresentaram a expressão diminuída (em vermelho) e 11 genes apresentaram a expressão aumentada (em verde) na comparação entre os grupos de animais jovens (sham YG vs. sepsis YG). Ademais, na comparação entre os grupos animais idosos (sham AG vs. sepsis AG) encontramos apenas 4 genes com a expressão diminuída (em vermelho) e 1 gene com a expressão aumentada (em verde)

Tabela 2 - Detalhamento dos genes diferencialmente expressos entre os grupos de animais idosos

Abreviação do Gene	Nome completo do Gene	Gene ID	Perfil de expressão	Log2fold change	Valor <i>p</i>
Hp	Haptoglobin	24464	Diminuído	-1,508	0,019
Bcl3	B-cell CLL/lymphoma 3	680611	Diminuído	-1,519	0,006
S100a8	S100 calcium binding protein A8	116547	Diminuído	-1,173	0,006
Upp1	Uridina fosforilase 1	289801	Diminuído	-1,143	0,019
StefinA3	stefin-3-like	100911790	Aumentado	2,002	0,048

6. Discussão

6.1 Efeitos da sepse que são independentes da idade

Característica de diversas doenças, a ativação aberrante do *nuclear factor kappaB* (NF- κ B) é um mecanismo fisiopatológico importante que induz o estado inflamatório intenso e pode causar danos intensos ao tecido do hospedeiro (Tilstra et al., 2011). A interação de toxinas bacterianas (PAMPs) e de moléculas liberadas após o dano celular (DAMPs) com os PRRs, presentes principalmente em células com funções imunológicas, constitui uma via importante de ativação do NF- κ B na sepse (Abraham, 2003).

O principal meio biológico para restringir a ativação do NF- κ B é através da sua interação com determinadas proteínas inibidoras denominadas I κ Bs, como o gene Bcl-3 (Herrington e Nibbs, 2016). Neste estudo, após a análise dos genes alterados, verificou-se que o Bcl-3 apresentou expressão diminuída após a sepse, independentemente da idade dos animais, o que sugere que a diminuição dos níveis dessa proteína acarreta neuroinflamação por ativação excessiva de NF- κ B.

O S100A8 foi outro gene cuja expressão diminuiu após a sepse, independentemente da idade dos animais. Também conhecido como calgranulin A ou myeloid-related protein (MRP) 8, esse gene faz parte de uma família de proteínas (S100) envolvidas em regulação enzimática e homeostase de Ca^{2+} , além de interagirem com o citoesqueleto (Donato et al., 2013). Um estudo publicado (Sroussi et al., 2012), realizado em cultura de neutrófilos, sugere um

papel importante dessa proteína na defesa contra o estresse oxidativo promovido pela inflamação aguda.

Outro estudo recente (Singer et al., 2016b) avaliou os efeitos da sepse em longo prazo (14 dias) em camundongos jovens submetidos ao modelo de CLP, concluindo que as modificações nos níveis gênicos de S100A8 são a alteração mais significativa no cérebro dos animais sépticos, quando comparados aos animais do grupo controle, apresentando um elevado *fold change* >25. Embora esse estudo tenha utilizado animais jovens e não tenha ficado claro se houve aumento ou diminuição da expressão de S100A8, os resultados apresentados corroboram os achados deste estudo, indicando que esta proteína está envolvida com o mecanismo pelo qual a sepse se manifesta no CNS em curto e longo prazo, possivelmente via aumento do estresse oxidativo.

Após indução da sepse, o gene da enzima uridina fosforilase 1 (UPP1) também apresentou expressão diminuída no encéfalo dos animais de forma independente da idade. As uridinas fosforilases (UPases) são enzimas fundamentais na regulação homeostática das concentrações de uridina intracelular. Dessa maneira, a uridina intracelular, um nucleósido de pirimidina, sob a ação das UPases, oferece um substrato para manter os níveis celulares de ATP adequados (Pizzorno et al., 2002). Um estudo realizado (Choi et al., 2008) evidenciou que um aumento dos níveis das UPases é importante para a sobrevivência das células nervosas após a isquemia realizada em modelos in vitro e in vivo.

Interessantemente, isquemias cerebrais são uma manifestação amplamente reconhecida em um quadro séptico (Sonneville et al., 2013). Assim,

se a diminuição dos níveis gênicos de UPP1 for diretamente proporcional à diminuição dos níveis enzimáticos, os resultados deste estudo sugerem que a lesão nervosa decorrente do processo isquêmico na sepse é influenciada por uma incapacidade dos neurônios em manter uma reserva energética adequada. Sob essa condição, a excitotoxicidade causada por excesso de glutamato é indicada como a causa da morte neuronal (Nicholls et al., 1999).

Apenas o gene Stefin A3 apresentou expressão aumentada entre os animais com sepse, independentemente da idade. Esse gene faz parte do grupo das proteínas inibidoras da enzima cisteína protease, as quais são importantes para a proteção das células contra a proteólise inapropriada (Barrett et al., 1986). Embora informações referentes à participação do Stefin A3 em doenças sejam escassas na literatura científica, um estudo, conduzido por Hosoi et al (2005), demonstrou que esse gene tem sua expressão gradualmente aumentada (em um período de 4 a 48 horas) em culturas de células da glia estimuladas com LPS. Curiosamente, os autores deste trabalho não encontram aumento de outras proteínas inibidoras da cisteína protease (cistatina A, cistatina B, cistatina C e cistatina F) após a estimulação das células, tais resultados sugerem que a ativação do gene da Stefin A3 seja uma forma específica de resposta das células da glia contra agentes causadores da infecção.

6.2 Efeitos da sepse que estão atrelados ao envelhecimento

Considerando o critério imposto (*fold change* ≥ 1 ou ≤ -1), uma diminuição da expressão do gene da haptoglobina (Hp) foi a única alteração encontrada exclusivamente nos animais idosos submetidos à sepse. A Hp é uma proteína cuja principal função biológica é ligar-se à hemoglobina livre (Hb), para,

assim, prevenir a perda de ferro e subsequentes danos nos rins após hemólise intravascular. Quando as células vermelhas são lisadas, a Hb se liga à Hp circulante formando o complexo Hp-Hb, que é então degradado pelo sistema reticuloendotelial (Shih et al., 2014).

Embora seja reconhecido que a Hp é sintetizada predominantemente no fígado, estudos revelam expressão dessa proteína também em outras partes do corpo, como pulmão, rins, coração, baço, timo e cérebro (Kalmovarin et al., 1991; Yang et al., 1995; Sanchez et al., 2001). Existem relatos de que os níveis de Hp são influenciados pelo processo inflamatório agudo (Wang et al., 2001) e que tal proteína exerce uma importante função antimicrobiana e antioxidante (Eaton et al., 1982, Theilgaard-Mönch et al., 2006).

Nesse contexto, uma diminuição dos níveis de Hp, demonstrada neste estudo, pode explicar o fato de o cérebro de indivíduos idosos ser mais sensível a infecções. Ademais, a diminuição dos níveis sanguíneos de Hp já foi descrita como um fator ligado ao aumento da mortalidade em pacientes diagnosticados com sepse e, em modelos animais de sepse, a suplementação com Hp demonstrou ser capaz de diminuir biomarcadores da inflamação sistêmica aguda (Arredouani et al., 2005; Janz et al., 2013)

Outra relevante observação refere-se às análises quantitativas representadas nas Figuras 5 e 6, as quais indicam um número reduzido de genes modificados em resposta à sepse em praticamente todas as áreas avaliadas do CNS dos animais idosos, em comparação com os animais jovens (exceto no hipocampo). Ainda nesse contexto, nota-se que as áreas avaliadas dos animais idosos compartilham um número consideravelmente menor de genes

modificados (apenas 14 genes), na comparação com o que foi observado no grupo de animais jovens (206 genes).

Seguindo o conceito de que parte importante do entendimento das doenças está atrelada à observação das reações do organismo, as quais têm como intuito restaurar, substituir, compensar e/ou preservar a função inata deste, sugerimos que o fato de os animais idosos apresentarem um número reduzido de genes alterados no encéfalo, frente à sepse, deve-se a uma resposta limitada do organismo em decorrência do envelhecimento. Isso culmina em uma menor possibilidade de manter o CNS em homeostase, tornando os idosos mais vulneráveis aos efeitos da sepse.

Uma resposta limitada do sistema imunológico em indivíduos idosos já foi descrita em um estudo, segundo o qual este grupo apresenta uma diminuição do número de células T após involução do timo (Douek e Koup, 2000). De maneira similar, o envelhecimento causa mudanças no tamanho do cérebro, as quais são acompanhadas por um aumento da incidência de acidentes vasculares cerebrais, lesões de substância branca e demência, além de um maior nível de comprometimento da memória, de neurotransmissores e dos hormônios (Peters, 2006).

Dessa maneira, a ineficiência para ativar mecanismos neuroprotetores, demonstrada neste estudo, poderia estar relacionada com a grande incidência de delirium nos pacientes idosos que desenvolvem sepse, sendo essa uma das principais causas de internações dos idosos em unidades de terapia intensiva (UTIs). Estima-se que a prevalência de delirium na população em geral seja de apenas 1-2%, enquanto entre os indivíduos idosos admitidos nas UTIs essa incidência aumenta de forma considerável para índices

em torno de 70-87%. (Tsuruta e Oda, 2016). Entretanto, para confirmar o que está sendo proposto nesta pesquisa, é necessário o desenvolvimento de novos estudos que enfatizem aspectos comportamentais.

Em resumo se as diminuições das quantidades de RNA dos genes Bcl-3, S100A8 e UPP1, representadas neste estudo, forem acompanhadas também por diminuições no âmbito proteico, sugere-se que o estado neuroinflamatório seja desencadeado principalmente por: excesso de ativação do NF- κ B, aumento do estresse oxidativo e isquemia cerebral causada por depleção das vias energéticas. Esses fatores são uma parcela importante do processo fisiopatológico das manifestações agudas da sepse no SNC, pois nota-se que essas diminuições são encontradas tanto nos animais jovens quanto nos idosos.

Em contrapartida, um aumento nos níveis do Stefin A3, também independentemente da idade dos animais, poderia ser entendido como uma alternativa rápida e comum que as células nervosas encontram para tentar se manter em funcionamento, pois esse aumento seria capaz de preservar quantidades adequadas das proteínas intracelulares, evitando, assim, as disfunções neurológicas.

Por outro lado, em relação às características específicas da sepse nos idosos, os resultados deste estudo sugerem que uma expressão diminuída da Hp encefálica parece estar associada a uma menor capacidade do cérebro de indivíduos idosos para ativar mecanismos neuroprotetores, em decorrência do processo de envelhecimento. Com isso, os idosos sépticos estariam mais suscetíveis a disfunções neurológicas, em comparação com os jovens, em virtude de uma menor resposta antimicrobiana e antioxidante. Ainda assim,

sugerimos a realização de novos estudos, a fim de compreender de forma mais detalhada a via pela qual a Hp está relacionada a disfunções neurológicas ligadas à sepse, especialmente em idosos.

7. Conclusões

Diante dos resultados obtidos é possível concluir que:

- As diminuições nas expressões gênicas de Bcl-3, S100A8 e UPP1 estão conjugadas aos efeitos da encefalopatia associada a sepse que se manifestam de forma independente da idade dos animais.
- O aumento na expressão do gene Stefin A3 está ligada aos efeitos da encefalopatia associada a sepse que são independentes da idade dos animais.
- A expressão diminuída de Hp encefálica é uma característica exclusiva da encefalopatia associada a sepse dos animais idosos.
- Animais idosos apresentam número reduzido de genes modificados em resposta à sepse em praticamente todas as áreas encefálicas avaliadas, em comparação com os animais jovens.

8. Anexo

Anexo A – Aprovação da Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 11/09/2014, **APROVOU** o documento datado de 08/09/2014 abaixo mencionado no Protocolo de Pesquisa nº **038/14** intitulado: **“Expressão de Peptídios antimicrobianos no tecido cerebral de ratos idosos submetidos ao modelo de sepse”** apresentado pelo Departamento de Clínica Médica.

- **Alteração do título** do protocolo 038/14 para **“ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS JOVENS E IDOSOS SUBMETIDOS AO MODELO DE LIGADURA E PERFUSÃO CECAL”**
- **Inclusão do aluno Mike Yoshio Hamasaki**, como pesquisador executante sob orientação do **Prof. Fabiano Pinheiro da Silva** no programa de **Pós Graduação – Ciências Médicas**.

CEUA-FMUSP, 11 de setembro de 2014

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

9. Referências

Abbott NJ. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol*. 2000;20(2):131-47

Abraham E. Nuclear factor-kappaB and its role in sepsis-associated organ failure. *J Infect Dis*. 2003;187 Suppl 2:S364-9.

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2(8):675-80.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.

Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(8):629-40.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29(7):1303-1310.

Arredouani MS, Kasran A, Vanoirbeek JA, Berger FG, Baumann H, Ceuppens JL. Haptoglobin dampens endotoxin-induced inflammatory effects both in vitro and in vivo. *Immunology*. 2005;114(2):263-71.

Banks WA, Erickson MA. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis*. 2010;37(1):26-32.

Barreto ML, Teixeira MG, Carmo EH. Infectious diseases epidemiology. *J Epidemiol Community Health*. 2006; 60(3): 192–95.

Barrett AJ, Fritz H, Grubb A, Isemura S, Järvinen M, Katunuma N, Machleidt W, Müller-Esterl W, Sasaki M, Turk V. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J*. 1986;236(1):312.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.

Benjamini Y. Discovering the false discovery rate. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Statistical Methodology)*. 2010;72(4):405-16.

Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(13):7041-6.

- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. *Chest* 1992;101(6):1644-55.
- Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997;112(1):235-43.
- Bone RC. Why sepsis trials fail. *JAMA*. 1996;276(7):565-6.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000;25;405(6785):458-62.
- Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, Follo C, Santambrogio L. Oxidative stress, inflammaging and immunosenescence. *J Proteomics*. 2011;74(11):2313-23.
- Chaudhry N, Duggal AK. Sepsis Associated Encephalopathy. *Adv Med*. 2014;2014:762320.
- Chaussabel D, Pascual V, Banchereau J. Assessing the human immune system through blood transcriptomics. *BMC Biol*. 2010;8:84.
- Choi JW, Shin CY, Choi MS, Yoon SY, Ryu JH, Lee JC, Kim WK, El Kouni MH, Ko KH. Uridine protects cortical neurons from glucose deprivation-induced death: possible role of uridine phosphorylase. *J Neurotrauma*. 2008;25(6):695-707.
- Christie JD. Microarrays. *Crit Care Med*. 2005;33(12 Suppl):S449-52.
- Chuang-Stein C, Tong DM. Multiple comparisons procedures for comparing several treatments with a control based on binary data. *Stat Med*. 1995;14(23):2509-22.
- Coalson JJ, Hinshaw LB, Guenter CA, Berrell EL, Greenfield LJ. Pathophysiologic responses of the subhuman primate in experimental septic shock. *J. Lab. Invest* 1975;32, 561–569.
- Collier B, Dossett LA, May AK, Diaz JJ. Glucose control and the inflammatory response. *Nutr Clin Pract* 2008;23:3.
- Cvijanovich N, Shanley TP, Lin R, Allen GL, Thomas NJ, Checchia P, et al. Validating the genomic signature of pediatric septic shock. *Physiol Genomics*. 2008;34(1):127-34.
- de Magalhaes JP, Curado J, Church GM. Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics*. 2009;25(7):875-81.
- Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med*. 2013;13(1):24-57.

- Douek DC, Koup RA. Evidence for thymic function in the elderly. *Vaccine*. 2000;18(16):1638-41.
- Eaton JW, Brandt P, Mahoney JR, Lee JT Jr. Haptoglobin: a natural bacteriostat. *Science*. 1982;215(4533):691-3.
- Ek M, Engblom D, Saha S, Blomqvist A, Jakobsson PJ, Ericsson-Dahlstrand A. Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. *Nature*. 2001;22;410(6827):430-1.
- Eskandari MK, Bolgos G, Miller C, Nguyen DT, DeForge LE, Remick DG. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J Immunol*. 1992;148(9):2724-30.
- Floyd RA, Towner RA, He T, Hensley K, Maples KR. Translational research involving oxidative stress and diseases of aging. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(5):931-41.
- Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth*. 2011;107(1):57-64.
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem*. 1997;272(17):11369-77.
- Godbout J, Johnson R. Age and neuroinflammation: A lifetime of psychoneuroimmune consequences. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2009;29:321-337.
- Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS, Lee WL. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. *Sci Transl Med* 2011;3:88ps25-88ps25.
- Götz T, Günther A, Witte OW, Brunkhorst FM, Seidel G, Hamzei F. Long-term sequelae of severe sepsis: cognitive impairment and structural brain alterations - an MRI study (LossCog MRI). *BMC Neurol*. 2014;14:145.
- Hamasaki MY, Machado MCC, Pinheiro da Silva F. Animal models of neuroinflammation secondary to acute insults originated outside the brain. *J Neurosci Res*. 2018;96(3):371-378.
- Hamasaki MY, Machado MCC, Pinheiro da Silva F. Septic Shock in Older People. In: Kumar V. Sepsis. Croatia: InTech; 2017. DOI: 10.5772/68080. Available from: <https://www.intechopen.com/books/sepsis/septic-shock-in-older-people>
- Harries LW. MicroRNAs as Mediators of the Ageing Process. *Genes (Basel)*. 2014;5(3):656-70.
- Heming N, Mazeraud A, Verdonk F, Bozza FA, Chrétien F, Sharshar T. Neuroanatomy of sepsis-associated encephalopathy. *Crit Care*. 2017;21(1):65.

- Herrington FD, Nibbs RJ. Regulation of the Adaptive Immune Response by the I κ B Family Protein Bcl-3. *Cells*. 2016;5(2):pii:E14.
- Hosoi T, Suzuki S, Okuma Y, Kawakami A, Ogawa N, Ozawa K, Nomura Y. LPS induces stefin A3 expression in mouse primary cultured glial cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;140(1-2):138-41.
- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348(2):138-50.
- Inouye SK, Westendorp RG, Saczynski JS. Delirium in elderly people. *Lancet*. 2014 Mar 8;383(9920):911-22.
- Inouye SK. Delirium in older persons. *N Engl J Med*. 2006;354:1157-1165.
- Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*. 1997;68(3):285-316.
- Janeway CA Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*. 1992;13(1):11-6.
- Janz DR, Bastarache JA, Peterson JF, Sills G, Wickersham N, May AK, Roberts LJ 2nd, Ware LB. Association between cell-free hemoglobin, acetaminophen, and mortality in patients with sepsis: an observational study. *Crit Care Med*. 2013;41(3):784-90.
- Kalmovarin N, Friedrichs WE, O'Brien HV, Linehan LA, Bowman BH, Yang F. Extrahepatic expression of plasma protein genes during inflammation. *Inflammation*. 1991;15(5):369-79.
- Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol*. 2014;258:5-16.
- Kochanek K, Xu J, Murphy S. Deaths: preliminary data for 2009. *Natl Vital Stat Rep*. 2011;59(21):1-51.
- Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):985-92.
- Machado ABM. Neuroanatomia Funcional. In: Vascularização do Sistema Nervoso Central e Barreiras Encefálicas. São Paulo: Atheneu; 2006. p. 87-99.
- Machado FR, Assunção MS, Cavalcanti AB, Japiassú AM, Azevedo LC, Oliveira MC. Chegando a um consenso: vantagens e desvantagens do Sepsis 3 considerando países de recursos limitados. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2016;28(4):361-5.

- MacLullich AM, Anand A, Davis DH, Jackson T, Barugh AJ, Hall RJ, Ferguson KJ, Meagher DJ, Cunningham C.. New horizons in the pathogenesis, assessment and management of delirium. *Age Ageing*. 2013;42(6):667-74.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348(16):1546-54.
- Maslove DM, Tang BM, McLean AS. Identification of sepsis subtypes in critically ill adults using gene expression profiling. *Crit Care*. 2012;16(5):R183.
- Maslove DM, Wong HR. Gene expression profiling in sepsis: timing, tissue, and translational considerations. *Trends Mol Med*. 2014;20(4):204-13.
- Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;1;5(1):4-11.
- Mayr FB, Yende S, Linde-Zwirble WT, Peck-Palmer OM, Barnato AE, Weissfeld LA, Angus DC. Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA* 2010;303:2495-503.
- Mazeraud A, Pascal Q, Verdonk F, Heming N, Chrétien F, Sharshar T. Neuroanatomy and Physiology of Brain Dysfunction in Sepsis. *Clin Chest Med*. 2016;37(2):333-45.
- Messaris E, Memos N, Chatzigianni E, Konstadoulakis MM, Menenakos E, Katsaragakis S, Voumvourakis C, Androulakis G: Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death survival in sepsis. *Crit Care Med* 2004;32:1764-1770.
- Mihaylova S, Killian A, Mayer K, Pullamsetti SS, Schermuly R, Rosengarten B. Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation on the cerebral microcirculation in endotoxemic rats. *J Neuroinflammation*. 2012;25;9:183.
- Morandi A, McCurley J, Vasilevskis EE, Fick DM, Bellelli G, Lee P, Jackson JC, Shenkin SD, Marcotrabucchi, Schnelle J, Inouye SK, Ely EW, MacLullich A. Tools to detect delirium superimposed on dementia: a systematic review. *J Am Geriatr Soc*. 2012;60(11):2005-13.
- Morrison DC, Ulevitch RJ. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am J Pathol* 1978;93:527-618.
- Muller L, Pawelec G. Aging and immunity impact of behavioral intervention. *Brain Behav Immun*. 2014;39:8-22.
- Nasa P, Juneja D, Singh O. Severe sepsis and septic shock in the elderly: An overview. *World J Crit Care Med*. 2012;1(1):23-30.
- Nicholls DG, Budd SL, Castilho RF, Ward MW. Glutamate excitotoxicity and neuronal energy metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;893:1-12.

Opal SM, Garber GE, LaRosa SP, Maki DG, Freebairn RC, Kinasewitz GT, Dhainaut JF, Yan SB, Williams MD, Graham DE, Nelson DR, Levy H, Bernard GR. Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). *Clin Infect Dis* 2003;37:50-8.

Opal SM, Girard TD, Ely EW. The immunopathogenesis of sepsis in elderly patients. *Clin Infect Dis*. 2005;41 Suppl 7:S504-12.

Organização Mundial da Saúde. Newborn death and illness. http://www.who.int/pmnch/media/press_materials/fs/fs_newborndeath_illness/en/

Pellegrina DVS, Severino P, Barbeiro HV, Andreghetto FM, Velasco IT, Souza HP, et al. Septic Shock in Advanced Age: Transcriptome Analysis Reveals Altered Molecular Signatures in Neutrophil Granulocytes. *PLoS One* 2015;10(6):e0128341.

Perry VH. The Impact of Systemic Inflammation on Brain Inflammation. *Brain Behav Immun*. 2004 Sep;18(5):407-13.

Peters R. Ageing and the brain. *Postgrad Med J*. 2006;82(964):84-8.

Pisani MA. Considerations in caring for the critically ill older patient. *J Intensive Care Med*. 2009;24(2):83-95.

Pizzorno G, Cao D, Leffert JJ, Russell RL, Zhang D, Handschumacher RE. Homeostatic control of uridine and the role of uridine phosphorylase: a biological and clinical update. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1587(2-3):133-44.

Rangel-frausto MS. Sepsis: still going strong. *Arch Med Res*. 2005;36(6):672-81.

Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S, Gårdlund B, Marshall JC, Rhodes A, Artigas A, Payen D, Tenhunen J, Al-Khalidi HR, Thompson V, Janes J, Macias WL, Vangerow B, Williams MD. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 2012;366:2055-64.

Romanovsky AA, Almeida MC, Aronoff DM, Ivanov AI, Konsman JP, Steiner AA, Turek VF. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front Biosci*. 2005;10:2193-216.

Rosenberger CM, Finlay BB. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(5):385-96.

Sales Jr HR, Souza PC, Japiassu A. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidade de terapia intensiva. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2006;18:9-17.

Salles MJC, Sprovieri SRS, Bedrikow R, Pereira AC, Cardenuto SL, Azevedo PRC, Silva TM, Golin V. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis 3/4 revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. *Rev Ass Med Brasil* 1999;45(1):86-92.

- Sanchez DJ, Armstrong L, Aguilar R, Adrian GS, Haro L, Martinez AO. Haptoglobin gene expression in human glioblastoma cell lines. *Neurosci Lett*. 2001;303(3):181-4.
- Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2001;2(10):947-50.
- Semmler A, Hermann S, Mormann F, Weberpals M, Paxian SA, Okulla T, Schäfers M, Kummer MP, Klockgether T, Heneka MT. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 38.
- Severino P, Silva E, Baggio-Zappia GL, Brunialti MK, Nucci LA, Rigato O Jr, da Silva ID, Machado FR, Salomao R. Patterns of gene expression in peripheral blood mononuclear cells and outcomes from patients with sepsis secondary to community acquired pneumonia. *PLoS One*. 2014;9(3):e91886.
- Shafteel SS, Griffin WS, O'Banion MK. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation*. 2008;26;5:7.
- Shanley TP, Cvijanovich N, Lin R, Allen GL, Thomas NJ, Doctor A, et al. Genome-level longitudinal expression of signaling pathways and gene networks in pediatric septic shock. *Mol Med*. 2007;13(9-10):495-508.
- Shih AW, McFarlane A, Verhovsek M. Haptoglobin testing in hemolysis: measurement and interpretation. *Am J Hematol*. 2014;89(4):443-7.
- Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004a: R251-60.
- Silva E, Pinheiro C, Junior VM. Epidemiologia. Consenso brasileiro de sepse - parte I. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2004b;16(2):97-101.
- Simone MJ, Tan ZS. The role of inflammation in the pathogenesis of delirium and dementia in older adults: a review. *CNS Neurosci Ther*. 2011 Oct;17(5):506-13.
- Singer BH, Newstead MW, Zeng X, Cooke CL, Thompson RC, Singer K, Ghantasala R, Parent JM, Murphy GG, Iwashyna TJ, Standiford TJ. Cecal Ligation and Puncture Results in Long-Term Central Nervous System Myeloid Inflammation. *PLoS One*. 2016b;11(2):e0149136.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016a;315(8):801-10.

- Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics*. 2008;26(5):425-34.
- Sonneville R, Verdonk F, Rauturier C, Klein IF, Wolff M, Annane D, Chretien F, Sharshar T. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann Intensive Care*. 2013;3(1):15.
- Spanò S, Galán JE. A novel pathway for exotoxin delivery by an intracellular pathogen. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(1):15-20.
- Sroussi HY, Lu Y, Villines D, Sun Y. The down regulation of neutrophil oxidative metabolism by S100A8 and S100A9: implication of the protease-activated receptor-2. *Mol Immunol*. 2012;50(1-2):42-8.
- Stevens RD, Sharshar T, Ely EW. Brain Disorders in Critical Illness: Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. In: Van Gool WA. Delirium and neurotransmitter dysfunction. Cambridge: Cambridge University Press; 2013. p. 139-149.
- Su DM, Aw D, Palmer DB. Immunosenescence: a product of the environment? *Curr Opin Immunol*. 2013;25(4):498-503.
- Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):570-9.
- Sun W, Pei L, Liang Z. mRNA and Long Non-coding RNA Expression Profiles in Rats Reveal Inflammatory Features in Sepsis-Associated Encephalopathy. *Neurochem Res*. 2017;42(11):3199-3219.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
- Tang BM, Huang SJ, McLean AS. Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review. *Crit Care*. 2010;14(6):R237.
- Tang BM, McLean AS, Dawes IW, Huang SJ, Lin RC. Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis. *Crit Care Med*. 2009;37(3):882-8.
- Theilgaard-Mönch K, Jacobsen LC, Nielsen MJ, Rasmussen T, Udbj L, Gharib M, Arkwright PD, Gombart AF, Calafat J, Moestrup SK, Porse BT, Borregaard N. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood*. 2006;108(1):353-61.
- Thom T, Haase N, Rosamond W, et al. Heart disease and stroke statistics—2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2006;113(6):e85-e151.
- Thomas L. The physiological disturbances produced by endotoxins. *Annu Rev Physiol* 1954; 16:467-91.

- Tillmann B, Wunsch H. Epidemiology and Outcomes. *Crit Care Clin*. 2018;34(1):15-27.
- Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF- κ B in Aging and Disease. *Aging Dis*. 2011;2(6):449-65.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 2004;429(6990):417-23.
- Tsuruta R, Oda Y. A clinical perspective of sepsis-associated delirium. *J Intensive Care*. 2016;4:18.
- Umberger R, Callen B, Brown ML. Severe sepsis in older adults. *Crit Care Nurs Q*. 2015;38(3):259-70.
- Volpe BT, Berlin RA, Frankfurt M. The brain at risk: the sepsis syndrome and lessons from preclinical experiments. *Immunol Res*. 2015;63(1-3):70-4.
- Wang Y, Kinzie E, Berger FG, Lim SK, Baumann H. Haptoglobin, an inflammation-inducible plasma protein. *Redox Rep*. 2001;6(6):379-85.
- Weidner CI, Wagner W. The epigenetic tracks of aging. *Biol Chem*. 2014.
- Wendel M, Heller AR. Mitochondrial function and dysfunction in sepsis. *Wien Med Wochenschr*. 2010;160(5-6):118-23.
- Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med*. 1999;340(3):207-14.
- Wong HR, Cvijanovich N, Allen GL, Lin R, Anas N, Meyer K, et al. Genomic expression profiling across the pediatric systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock spectrum. *Crit Care Med*. 2009;37(5):1558-66.
- Wong HR, Freishtat RJ, Monaco M, Odoms K, Shanley TP. Leukocyte subset-derived genomewide expression profiles in pediatric septic shock. *Pediatr Crit Care Med*. 2010;11(3):349-55.
- Wrona D. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol*. 2006;172(1-2):38-58.
- Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. 2011;208(13):2581-90.
- Yamagata K, Matsumura K, Inoue W, Shiraki T, Suzuki K, Yasuda S, Sugiura H, Cao C, Watanabe Y, Kobayashi S. Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J Neurosci*. 2001;15;21(8):2669-77.

Yang F, Friedrichs WE, Navarajo-Ashbaugh AL, deGraffenried LA, Bowman BH, Coalson JJ. Cell type-specific and inflammatory-induced expression of haptoglobin gene in lung. *Lab Invest.* 1995;73(3):433-40.

Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010;464:104-107.