Isabela Casagrande Jeremias

Investigação das alterações imunológicas em camundongos submetidos ao modelo animal de sepse por ligação e perfuração cecal (CLP) com alterações cerebrais

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

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Processos
Inflamatórios e Alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia
Soriano

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Jeremias, Isabela Casagrande

Investigação das alterações imunológicas em camundongos submetidos ao modelo animal de sepse por ligação e perfuração cecal (CLP) com alterações cerebrais / Isabela Casagrande Jeremias. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientador: Francisco Garcia Soriano.

Descritores: 1.Sepse 2.Inflamação 3.Encefalopatia associada a sepse
4.Linfócitos 5.Acetilcolina

USP/FM/DBD-270/15

Aos meus pais, Jaka e Rosinha,

e ao meu noivo, Sandro,

pelo incentivo, amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao programa de Emergências Clínicas, por fornecerem as condições para a realização deste trabalho, e aos professores e funcionários dessa instituição, por todo o suporte necessário.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização desse projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Soriano, Chico, pela amizade, ajuda, compreensão, sabedoria e exemplo de profissionalismo. Muitíssimo obrigada pela oportunidade e pelo aprendizado oriundo de um pesquisador admiravelmente completo!

Um agradecimento especial a Thaís e Suely por todo apoio e constante ajuda para a realização deste trabalho. E a todas as pessoas que participaram de alguma forma deste trabalho.

Aos funcionários e amigos do LIM 51: Kelli, Denise, Hermes, Gerlado, Fátima.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Anne, Joleen, Wermerson, Vivian, Ricardo, Rosângela, Ândre, Mariana, por deixarem os trabalhos no laboratório muito mais divertidos.

De maneira muito especial à Vanessa pela ajuda, companheirismo, momentos alegres e pela grande amizade formada.

Aos meus mais antigos e preciosos amigos, por se importarem, por lembrarem de mim e por tudo que aprendi durante o tempo em que estivemos perto. Sinto saudades.

Ao meu noivo, Sandro, que ficou ao meu lado, dando apoio e força que preciso. Obrigada pela alegria, companheirismo, atenção, principalmente, por todo amor dedicado.

À minha família, pelo amparo, pelo carinho e dedicação.

Aos meus pais, exemplos de dedicação, pelo amor, educação, presença constante, confiança e pelo incentivo em cada nova etapa da minha vida.

À Deus, especialmente pela vida.

*“Uma mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará a seu tamanho original”*

Albert Einsten

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

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 Julia 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.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução.....	9
2. Objetivos.....	10
2.1 Geral.....	10
2.2 Específicos	10
3. Revisão da Literatura.....	12
3.1 Sepse	12
3.1.1 Definição	12
3.1.2 Epidemiologia	13
3.1.3 Fisiopatologia.....	14
3.1.4 Resposta imunológica	16
3.1.5 Imunodepressão.....	18
3.1.6 Encefalopatia séptica.....	20
3.1.6.1 Teste comportamental SHIRPA	22
3.1.6.2 S100 β	22
3.1.7 Ligação e perfuração cecal.....	24
3.2 Interações entre sistema nervoso central e sistema imunológico	25
3.3 Acetilcolina.....	28
3.3.1 Donepezila.....	29
3.3.2 VAcHT	30
4. Materiais e Métodos	32
4.1 Animais	32
4.2 Experimentos	33
4.2.1 Experimento Agudo	33
4.2.2 Experimento Crônico	34

4.2.3 Efeito da acetilcolina na evolução tardia da sepse	34
4.3 Ligação e perfuração cecal.....	35
4.4 SHIRPA	36
4.5 ELISA	37
4.6 Histologia e Tunel.....	38
4.7 Isolamento de Linfócitos.....	39
4.8 Caracterização dos linfócitos	40
4.9 Morte celular e ciclo celular	40
4.10 Análise estatística	41
5. Resultados.....	43
5.1 Experimento Agudo	43
5.1.1 Análise da sobrevida nas diferentes gravidades do CLP.....	43
5.1.2 Alterações neurológicas nas diferentes gravidades do CLP.....	44
5.1.3 Perfil das células no baço de diferentes gravidades do CLP.....	47
5.1.4 Perfil inflamatório nas diferentes gravidades do CLP	50
5.2 Experimento Crônico	51
5.2.1 Alterações neurológicas em sobreviventes do CLP	51
5.2.2 Perfil das células do baço em sobreviventes do CLP.....	55
5.2.3 Perfil inflamatório em sobreviventes do CLP	61
5.3 Efeito da acetilcolina na evolução tardia da sepse.....	62
5.3.1 Análise da sobrevida nos animais com donepezila e VACHT KD.....	62
5.3.2 Alterações neurológicas nos animais com donepezila e VACHT KD.....	63
5.3.3 Perfil das células do baço nos animais com donepezila e VACHT KD	67
5.3.4 Perfil inflamatório nos animais com donepezila e VACHT KD.....	73
6. Discussão	75
6.1 Experimento Agudo	75
6.2 Experimento Crônico	79
6.3 Efeito da acetilcolina na evolução tardia da sepse.....	85
7. Conclusão	90
7. Referências	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Curva de sobrevida nas diferentes gravidades de CLP	43
Figura 02. SHIRPA 6 horas após o CLP em diferentes gravidades.	45
Figura 03. Os níveis plasmáticos de S100 β 6 horas após o CLP	46
Figura 04. Níveis de citocinas no hipocampo 6 horas após o CLP	46
Figura 05. Peso do baço 6 horas após o CLP	47
Figura 06. Caracterização de linfócitos no baço 6 horas após o CLP	48
Figura 07. Correlação entre os linfócitos e o S100 β 6 horas após o CLP	49
Figura 08. Níveis de citocinas no baço 6 horas após o CLP	50
Figura 09. Níveis de citocinas no plasma 6 horas após o CLP.....	51
Figura 10. Teste comportamental SHIRPA 6 horas após o CLP	52
Figura 11. Teste comportamental SHIRPA 15 dias após o CLP.....	53
Figura 12. Os níveis plasmáticos de S100 β 15 dias após o CLP.....	54
Figura 13. Peso do baço 15 dias após o CLP	55
Figura 14. Corte histológico do baço, 15 dias após o CLP	56
Figura 15. Caracterização de linfócitos no baço 15 dias após o CLP	57
Figura 16. Correlação entre os linfócitos e o S100 β 15 dias após o CLP	58
Figura 17. Morte celular no baço 15 dias após o CLP	59
Figura 18. Correlação entre a morte celular e o S100 β 15 dias após o CLP	59
Figura 19. Ciclo celular no baço 15 dias após o CLP	60
Figura 20. Curva de sobrevida após CLP no experimento com donepezila.....	62
Figura 21. Curva de sobrevida após CLP no experimento VACHT KD	63
Figura 22. Teste comportamental SHIRPA 6 horas após o CLP com donepezila	64
Figura 23. Teste comportamental SHIRPA 6 horas após o CLP no VACHT KD.....	65
Figura 24. Peso do baço 15 dias após o CLP com donepezila	67
Figura 25. Peso do baço 15 dias após o CLP no VACHT KD.....	67
Figura 26. Caracterização de linfócitos no baço 15 dias após o CLP com donepezila ..	69
Figura 27. Caracterização de linfócitos no baço 15 dias após o CLP no VACHT KD...	70
Figura 28. Morte celular no baço 15 dias após o CLP com donepezila	71
Figura 29. Morte celular no baço 15 dias após o CLP no VACHT KD.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Citocinas no hipocampo 15 dias após CLP.	54
Tabela 02. Citocinas no baço 15 dias após CLP.	60
Tabela 03. Citocinas no plasma 15 dias após CLP.....	61
Tabela 04. Citocinas no hipocampo 15 dias após CLP com donepezila.	66
Tabela 05. Citocinas no hipocampo 15 dias após CLP no VACHT KD.....	66
Tabela 06. Citocinas no baço 15 dias após CLP com donepezila.	72
Tabela 07. Citocinas no baço 15 dias após CLP no VACHT KD.....	73
Tabela 08. Citocinas no plasma 15 dias após CLP com donepezila.....	74
Tabela 09. Citocinas no plasma 15 dias após CLP no VACHT KD.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – acetilcolina

AChE – enzima acetilcolinesterase

BHE – barreira hematoencefálica

CARS – síndrome da resposta compensatória sistêmica

ChAT – enzima colina acetiltransferase

CHT1 – transportador de colina de alta afinidade

CLP – ligação e perfuração cecal

CO₂ – dióxido de carbono

DAMP – padrão molecular associado ao dano

DNA – ácido desoxirribonucleico

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPM – erro padrão da média

HE – hematoxilia eosina

HMGB1 – proteína de alta mobilidade box 1

IL – interleucina

IRAK – quinase associada ao receptor de IL-1

IRF3 – fator 3 de regulação do interferon

LBP – proteína ligante de lipopolissacarídeo

LPS – Lipopolissacarídeo

MCP – proteína quimiotática de monócito

MD-2 – proteína de diferenciação mielóide-2

MIP – proteína inflamatória de macrófago

mRNA – RNA mensageiro

MyD88 – proteína citosólica ativada pelo toll

NF- κ B – fator de transcrição nuclear - κ B

PAMP – padrão molecular associado ao patógeno

PI – iodeto de propídeo

RNA – ácido ribonucleico

SHIRPA – *SmithKline/Harwell/ImperialCollege/RoyalHospital/Phenotype Assessment*

SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SNC – sistema nervoso central

SPF – livres de patógenos específicos

Th1 – células T com padrão de resposta pró-inflamatória

Th2 – células T com padrão de resposta anti-inflamatória

TIRAP – proteína adaptadora contendo Toll-IL-1R

TLR – receptor do tipo *toll*

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

TOLL – denominação da proteína de reconhecimento de LPS

TRAF – proteína adaptadora associada ao receptor de TNF

TRAM – molécula adaptadora relacionada a TRIF

TRIF – proteína adaptadora contendo o domínio TIR indutora de interferon β

TUNEL – *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

UTI – unidade de terapia intensiva

VAcHT – transportador vesicular de acetilcolina

VAcHT KD – animais *knockdown* para VAcHT

WT – *wild-type*

α 7nAChR – receptores α -7 nicotínicos de acetilcolina

RESUMO

Jeremias, IC: *Investigação das alterações imunológicas em camundongos submetidos ao modelo animal de sepse por ligação e perfuração cecal (CLP) com alterações cerebrais* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A sepse é caracterizada por um desequilíbrio entre a resposta pró- e anti-inflamatória às infecções. Um dos principais componentes da resposta do hospedeiro no choque séptico são as interações recíprocas entre o sistema imune e o sistema nervoso central, desta forma o objetivo deste estudo foi investigar o desenvolvimento de alterações neurológicas e sua associação com alterações imunológicas em fases iniciais e tardias após a sepse por ligação e perfuração cecal (CLP). Dividimos em três experimentos: agudo, crônico e efeito da ACh na evolução tardia da sepse. No experimento agudo utilizamos camundongos Balb/c, induzimos sepse por CLP em diferentes gravidades (leve, moderado e grave), 6 horas após o CLP foi realizado teste comportamental SHIRPA e logo após os animais foram sacrificados. No experimento crônico os camundongos Balb/c foram submetidos ao CLP leve, o SHIRPA foi realizado 6 horas e 15 dias após o CLP e os animais foram sacrificados 15 dias após o CLP. No experimento dos efeitos da ACh utilizamos camundongos Balb/c que receberam a droga donepezila (5 mg/kg/dia, oralmente) sete dias antes do CLP leve até o dia do sacrifício e os camundongos homozigotos mutantes VACHT KD também submetidos ao CLP leve. O teste comportamental SHIRPA foi realizado 6 horas após o CLP e os animais sacrificados 15 dias após o CLP. O plasma, o baço e o hipocampo foram removidos em todos os experimentos. Os níveis do S100 β foram medidos no plasma. Os baços foram pesados, e por citometria de fluxo foi caracterizado os linfócitos (linfócitos T citotóxicos, linfócitos T auxiliares, linfócitos B, células T reguladoras e células Th17) e morte celular (Apoptose inicial, necrose e apoptose tardia). Os níveis de citocinas no baço, hipocampo e plasma foram determinados por ELISA. Nossos resultados mostram que no experimento agudo, 6 horas após o CLP a encefalopatia é diferente dependendo da gravidade da sepse, e o perfil de linfócitos no baço não é alterado por nenhuma gravidade da sepse. No entanto, a ativação de células do baço foi indicada no nosso estudo por variações na quantidade de citocinas no baço. No experimento crônico observamos que 15 dias após o CLP os animais apresentam encefalopatia séptica, e esta está correlacionada com a diferenciação e morte celular de linfócitos do baço, o que leva a um alto perfil imunossupressor. No experimento da ACh mostramos que a estimulação da transmissão colinérgica, utilizando donepezila, diminui a inflamação, por aumentar linfócitos, morte linfocitária e diminuir citocinas pró-inflamatória. E, ao contrário, a diminuição da transmissão colinérgica, experimento VACHT KD, observou-se uma diminuição de linfócitos, sem morte celular e aumento da inflamação. Desta forma, concluímos que a alteração neurológica nos animais com sepse está associada com as alterações imunológicas tardias e que a ACh tem um importante papel no perfil imunológico 15 dias após o CLP.

Descritores: sepse; inflamação; encefalopatia associada à sepse; linfócitos; acetilcolina

ABSTRACT

Jeremias, IC: *Investigation of changes immunological in mice submitted to model animal of sepsis by cecal ligation and puncture (CLP) with brain injure* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Sepsis is characterized by an imbalance between pro- and anti-inflammatory responses to infection. One of the main components of the host response in septic shock are the reciprocal interactions between the immune system and the central nervous system, so the aim of this study was to investigate the development of neurological disorders and their association with immunological changes in early and late stages after sepsis by cecal ligation and puncture (CLP). We divided in three experiments: acute, chronic and chronic ACh. In acute experiment we use Balb/c mice, induce sepsis by CLP in different severities (mild, moderate and severe), 6 hours after CLP was conducted behavioral test SHIRPA and after the animals were sacrificed. In the chronic experiment Balb/c mice were subjected to CLP mild, the SHIRPA was performed 6 hours and 15 days after CLP, and animals were sacrificed 15 days after CLP. In chronic ACh experiment use Balb/c mice that received the drug Donepezil (5 mg/kg/day, orally) seven days before the CLP mild until the day of sacrifice and use too mice homozygous mutants KD VACHT also submitted to CLP mild. The SHIRPA behavioral test was performed 6 hours after CLP and the animals were sacrificed 15 days after CLP. The plasma, spleen and hippocampus were removed in all experiments. The levels of S100 β were measured in plasma. The spleens were weighed, and flow cytometry was characterized lymphocytes (cytotoxic T lymphocytes, helper T lymphocytes, B lymphocytes, regulatory T cells and Th17 cells) and cell death (apoptosis initial, necrosis and DNA fragmentation). Cytokine levels in the spleen, hippocampus and plasma were determined by ELISA. Our results show that in the acute experiment, 6 hours after CLP encephalopathy is different depending on the severity of sepsis, since the profile of the spleen lymphocytes is not changed by any severity of sepsis. However, the spleen cell activation was shown in this study by variations in the quantity of cytokines in the spleen. In the chronic experiment we observed that 15 days after CLP animals have septic encephalopathy, and this correlates with cell differentiation and the death of spleen lymphocytes, which leads to a high immunosuppressive profile. Since in the chronic ACh experiment have shown that stimulation of cholinergic transmission, using donepezil, reduces inflammation by increasing lymphocytes, lymphocyte death and decreasing proinflammatory cytokine. And, conversely, the reduction in cholinergic transmission, KD VACHT experiment, we observed a decrease of lymphocytes, and increase cell death without inflammation. Thus, we conclude that the neurological deficits in animals with sepsis is associated with immunological late changes and ACh plays an important role in the immune profile 15 days after CLP.

Descriptors: sepsis; inflammation; sepsis-associated encephalopathy; lymphocytes; acetylcholine

1. Introdução

Sepse é a principal causa de morte de pacientes em unidades de terapia intensiva e é causada pela ativação imune inadequada devido a bactérias e componentes bacterianos liberados. Assim, a sepsé é caracterizada por um desequilíbrio entre a resposta pró- e anti-inflamatória às infecções. Quando a cascata da sepsé é acionada, uma resposta sistêmica desregulada ocorre, podendo progredir para insuficiência de múltiplos órgãos que inclui a encefalopatia séptica. A encefalopatia séptica é uma complicação comum, mas pouco compreendida, afetando 8-70% de pacientes sépticos. Ela pode ser definida como um distúrbio cerebral resultante de sinalização celular e metabólica mediada por componentes inflamatórios.

Os avanços recentes na compreensão da biologia de toxicidade de citocinas levaram à descoberta da "via anti-inflamatória colinérgica", que envolve a comunicação bidirecional entre o cérebro e o sistema imunológico. A ativação desta via, quer por estimulação elétrica do nervo vago ou através de abordagens farmacológicas, foi mostrado para melhorar significativamente patologias induzidas por modelos de doenças mediadas por citocinas, incluindo a endotoxemia e sepsé. Esta via é funcionalmente ligado ao baço através do ramo celíaca comum do nervo vago e a estimulação do nervo vago atenua a inflamação sistêmica e é protetor contra a sepsé.

Sabendo que as interações recíprocas entre o sistema imune e o sistema nervoso central são consideradas um dos principais componentes da resposta do hospedeiro no choque séptico, a hipótese principal deste estudo é que as alterações cerebrais decorrentes da sepsé induzirão disfunção do sistema imunológico.

2. Objetivos

2.1 Geral

Investigar o desenvolvimento de alterações neurológicas e sua associação com alterações imunológicas em fases iniciais e tardias após a sepse por ligação e perfuração cecal (CLP).

2.2 Específicos

- Avaliar as alterações neurológicas em fases iniciais e tardias após a sepse.

Estratégia: Pela análise do teste comportamental SHIRPA, os níveis plasmáticos de S100 β e as citocinas no hipocampo, caracterizamos as alterações neurológicas.

- Avaliar a alteração do perfil das células do baço em fases iniciais e tardias após a sepse:

- Tamanho e peso do baço;
- O perfil das populações de linfócitos: T CD4, CD8, Treg, T17 e linfócitos B;
- O perfil de citocinas no baço;

Estratégia: Através de análise por citometria de fluxo caracterizamos e quantificamos as diversas linhagens de linfócitos. E por ELISA quantificamos as diversas citocinas no baço.

- Avaliar se a alteração no perfil das células imunológicas do baço decorre de:

- Apoptose;

- Necrose;

Estratégia: Através de análise por citometria de fluxo utilizamos marcadores que nos indicaram a presença de apoptose ou necrose celular.

- Avaliar o perfil inflamatório sistêmico em fases iniciais e tardias após a sepse.

Estratégia: Através de análise por Milliplex verificamos o perfil de diversas citocinas no plasma.

- Avaliar o efeito da acetilcolina no desenvolvimento de alterações imunológicas e sua associação com danos cerebrais em fase tardia após a sepse.

Estratégia: Através da utilização de um inibidor da acetilcolinesterase e animais homozigotos mutantes VACht KD verificamos as alterações imunológicas através do teste comportamental SHIRPA e perfil imunológico através do perfil das células do baço e as citocinas.

3. Revisão da Literatura

3.1 Sepses

3.1.1 Definição

Na reunião de consenso da *American College of Chest Physicians* e da *Society of Critical Care Medicine*, em 1991, a sepsis foi definida como a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) associada a um quadro infeccioso (Bone et al., 1992).

A sepsis é caracterizada pelo desenvolvimento de alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e imunológicas associadas à infecção, e quando complicada pela disfunção orgânica é denominada sepsis grave. O choque séptico se refere a um estado de falência circulatória aguda com hipotensão arterial apesar da reposição volêmica, fazendo-se necessário a terapia vasopressora para manutenção de uma pressão arterial a valores aceitáveis (Vincent e Korhut, 2008; Barbeiro et al., 2011; Lorigados et al., 2011; Melo et al., 2011).

Na sepsis, a desregulação dos mecanismos imunológicos pode resultar em uma perda de controle da inflamação. A fase precoce da sepsis é caracterizada pela excessiva ativação, no hospedeiro, da produção de mediadores inflamatórios após o sistema de reconhecimento de patógenos ser ativado. A excessiva produção de radicais livres e enzimas causam danos teciduais em grande escala, leva a uma desregulação de vários sistemas do corpo. Atualmente, há evidências de que a sepsis é uma condição que afeta não só o sistema imunológico, mas também outros sistemas biológicos (Rittirsch et al., 2008).

Por isso, a sepse é uma enfermidade extremamente complexa, pelo desequilíbrio entre a resposta pró e anti-inflamatória induzindo ao longo do tempo uma falência múltipla de órgãos, sendo uma causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Hotchkiss e Karl, 2003; Vandijck et al., 2006).

3.1.2 Epidemiologia

Nos Estados Unidos, dados de mortalidade indicam que a sepse está entre as 10 causas mais comuns de morte (Kung et al., 2008) indicando que ocorrem aproximadamente 751.000 casos de sepse por ano (Remick, 2007) e se relata que o choque séptico é a causa de 6-15% das internações em unidades de terapia intensiva (UTI) (Antonelli et al., 2007). A taxa de mortalidade anual é de 32,2% para sepse grave e 54,1% para choque séptico (Vincent e Abraham, 2006), sendo que os índices aumentam continuamente nos pacientes de maior idade (Martin et al., 2003), isso ocorre devido à tendência epidemiológica nessa faixa etária onde há um aumento de pacientes cronicamente doentes (O'brien et al., 2007).

No Brasil, através de estudos do *Brazilian Sepsis Epidemiologic Study* (BASES) analisou por 8 meses os dados fornecidos por 5 hospitais dos estados de São Paulo e Santa Catarina e mostrou que cerca de 25% dos pacientes internados nas UTIs apresentaram diagnósticos de sepse grave e choque séptico, com uma mortalidade de 34,7% para sepse, 47,3% para sepse grave e 52,2% para choque séptico (Silva et al., 2004). Outro estudo analisou em diferentes UTIs que a mortalidade por sepse foi de 16,7%, para sepse grave, 34,4% e para choque séptico, 65,3% (Sales e Andrade, 2006).

A taxa de mortalidade em outro estudo foi de 21,4% para sepse, 30,9% para sepse grave e 47,7% para choque séptico (Fernandes, 2008).

O Instituto Latino Americano de Sepse em sua campanha sobrevivendo a sepse (*Surviving Sepsis Campaign*) apresentou em dezembro de 2014, no seu relatório trimestral, dados gerais de mortalidade de pacientes sépticos no Brasil e no mundo. No Brasil, a mortalidade de pacientes com sepse grave é de 31,6% e no mundo 23,9%. No entanto, pacientes com choque séptico no Brasil a mortalidade chega a 64,2% enquanto no mundo é de 37,4% (ILAS, 2014). Os dados mundiais são referentes a 2010 (Levy et al., 2010).

Sepse e choque séptico representam a causa mais importante de morte em UTIs de adultos, superando as doenças cardiovasculares (Nguyen et al., 2006). A grande incidência, associada à gravidade da sepse seria por si só o suficiente para justificar o aprofundamento no conhecimento de sua fisiopatologia e a tentativa de novas possibilidades terapêuticas.

3.1.3 Fisiopatologia

A maior causa de infecção na sepse é por bactérias Gram positivas e Gram negativas, mas a resposta inflamatória do hospedeiro também pode ser desencadeada por fungos e vírus (Nduka e Parrillo, 2009). Sessenta por cento dos casos ocorre pela invasão de bactérias Gram negativas e quarenta por cento são decorrentes de bactérias Gram positivas (Angus et al., 2001a; Alberti et al., 2003; Hanna, 2003).

O lipopolissacarídeo (LPS) e as exotoxinas são liberados normalmente durante a replicação da bactéria e/ou como consequência de sua morte, devido à lise da parede celular. Diversos receptores foram encontrados nos últimos anos, capazes de reconhecer essas moléculas e ativar assim, a resposta imune inata (Triantafilou e Triantafilou, 2002). Eles são reconhecidos por receptores encontrados em células do sistema imune inato como neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos e células dendríticas. Um dos maiores avanços no entendimento do reconhecimento microbiano pelo sistema imune inato tem sido a identificação de receptores do tipo *Toll* (TLRs), que agem como sensores de alvos moleculares associados a patógenos, reconhecendo e disparando a resposta do hospedeiro (Janeway e Medzhitov, 2002; Creagh e O'Neill, 2006; Opitz et al., 2009).

A ativação dos macrófagos pelo LPS se dá através da ligação à proteína ligante de LPS (LBP) e interage com o CD-14 (proteína da superfície externa da membrana celular de monócitos que facilita a ativação celular induzida pelo LPS). (Zhang e Morrison, 1993; Benjamini et al., 2002). O CD-14 em conjunto com a proteína de diferenciação mielóide-2 (MD-2) uma pequena molécula sem região transmembrana, participam da apresentação de LPS para o receptor similar ao *Toll* e em 1998, Poltorak e colaboradores, mostraram que a sinalização pelo LPS é transmitida pelo receptor *Toll-like-4* (TLR-4) o primeiro membro da família a ser caracterizado em mamíferos (Poltorak et al., 1998).

TLR-4 é capaz de ativar vias de sinalização distintas que envolvem diferentes cofatores e moléculas adaptadoras intermediando diversas respostas imunes. Uma das vias de sinalização é a “via de sinalização TLR dependente de MyD88” (proteína citosólica ativada pelo *toll*) que é ativada pela ligação direta do domínio TIR citoplasmático com a proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP), que

recruta a molécula adaptadora MyD88 e de quinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAK). Após autofosforilação das IRAK, a proteína adaptadora associada ao receptor de TNF (TRAF6) interage com complexos de proteínas, ativando o complexo I κ B-quinase (IKK) e por fim, ativando o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (Kawai e Akira, 2006).

A outra via de sinalização, a “via de sinalização independente de MyD88” envolve a proteína adaptadora contendo domínio TIR indutora de interferon β (TRIF) ou a molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM), que levam à fosforilação do fator 3 de regulação do interferon (IRF3), induzindo produção de interferon e moléculas co-estimulatórias (Medzhitov, 2001; Kawai e Akira, 2006; O’Neill e Bowie, 2007).

Uma vez que os patógenos são identificados pelas células dendríticas – cuja função é apresentar antígeno aos linfócitos – é disparada a resposta imune adaptativa, com consequente liberação de citocinas, resultando em uma sequência de eventos bioquímicos e clínicos (Hanna, 2003; Weighardt e Holzmann, 2007; Matsuda et al., 2012).

3.1.4 Resposta imunológica

A resposta imunológica é realizada pela sucessão dos mecanismos inatos e adaptativos, ou seja, nas fases iniciais da infecção há um predomínio das respostas inatas e nas fases mais tardias os linfócitos passam a gerar respostas imunológicas adaptativas (Kourilsky e Truffa-Bachi, 2001).

As células do sistema imune inato, as quais incluem monócitos, macrófagos e neutrófilos compõe a primeira linha de resposta à infecção e lesão (Wang e Deng, 2008). A imunidade inata é resultante de um sistema inespecífico de defesa imunológico encontrado em organismos multicelulares. Durante a infecção, a imunidade inata faz o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), tais como LPS, peptídeooglicano, RNA (ácido ribonucleico) de fita dupla; ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), tais como proteína do choque térmico, ácido úrico, anexinas, e HMGB1, usando receptores de reconhecimento – como os TLR-2, TLR-4 e TLR-9 (Brightbill et al., 1999; Wang et al., 1999; Li et al., 2003).

A sinalização TLR pode induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento da expressão de moléculas coestimuladoras, as quais são ativadas não apenas pela imunidade inata, como também pela imunidade adquirida (Kaisho e Akira, 2002). As células da imunidade inata infiltram nos tecidos infectados e liberam diversas citocinas, como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-12 e quimiocinas como IL-8, proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1s e MIP-2) e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) (Baggiolini e Loetscher, 2000; Luster et al., 2005; Wang e Deng, 2008). Em resposta a infecção ou dano causado pelos microrganismos, o sistema imune inato responde imediatamente ao estímulo, removendo os patógenos invasores e, após sua eliminação, ocorre uma regressão do quadro inflamatório retornando a homeostase imunológica. Os patógenos ou mediadores pró-inflamatórios endógenos podem extravasar para a corrente sanguínea, ocasionando a sepse (Wang e Deng, 2008).

A principal diferença entre a resposta imunológica inata e adaptativa é que a resposta adaptativa é altamente específica e desenvolve memória contra o germe agressor. A expansão clonal dos linfócitos em resposta a um agente infeccioso é

absolutamente necessária para geração de uma resposta imunológica eficiente. O desenvolvimento de clones diferenciados em células efectoras leva de 3 a 5 dias. Os linfócitos “memorizam” a estrutura do agente agressor e passam a responder mais rápida e eficientemente no caso de haver uma reinfecção pelo mesmo patógeno (Kourilsky e Truffa-Bachi, 2001).

Desta forma, a imunidade adquirida é mediada por linfócitos T e B, tem alta especificidade para microrganismos através da combinação dos receptores com moléculas dos patógenos. Além disso, é capaz de ativar fatores de transcrição e de promover secreção de citocinas pró-inflamatórias junto às células T, além de aumentar a síntese de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13), modular a expressão de receptores de citocinas e liberar receptores solúveis e antagonistas, bem como atuar sobre o sistema imune inato (Sikora et al., 2001; Faix, 2013). Contudo, este período de tempo para desenvolver a resposta adaptativa é bastante longo, e suficiente para que as bactérias produzam graves danos ou a morte do hospedeiro, desta forma é necessário um mecanismo de ação rápida, ou melhor, de ação imediata. Os mecanismos efetores da imunidade inata são ativados imediatamente após a invasão e tem papel importante na defesa do hospedeiro, durante os estágios iniciais da infecção (Sikora et al., 2001).

3.1.5 Imunodepressão

A literatura tem discutido se a sepse é caracterizada por curto período da SIRS e seguido por um sustentado período de imunossupressão e resposta anti-inflamatória. Roger Bone, em 1997, deu o nome de CARS (síndrome da resposta compensatória

sistêmica) a essa resposta anti-inflamatória, a qual ele interpretou como uma tentativa do organismo de contra-regular a SIRS, podendo, em determinados casos, se tornar prevalente e ocasionar fenômenos de imunodepressão nos pacientes que apresentam esse quadro, como por exemplo, respostas de hipersensibilidade alteradas e maiores riscos de infecções secundárias e por germes oportunistas (Bone et al., 1997; Oberholzer et al., 2002; Moine e Abraham, 2004)

A CARS é caracterizada por defeito na apresentação de antígeno, paralisia de macrófagos, anergia de células T, supressão de proliferação de células T, diminuição da proliferação de células Th1 e aumento de apoptose das células B e T (da Silva e Velasco, 2007).

A contribuição da apoptose na gênese da SIRS e da CARS tem sido muito debatida. De modo geral, a apoptose das células efectoras do sistema imune, como linfócitos e células dendríticas, é um evento importante para a evolução do quadro séptico e tem sido muito estudada (Wolfárd et al., 2000; Kumar et al., 2001; Wu et al., 2001). A eliminação de um grande número de células do sistema imune compromete a defesa efetiva do hospedeiro. A apoptose na sepse foi alvo de estudos, demonstrando que a prevenção dos eventos apoptóticos aumenta a sobrevivência de maneira relevante em modelos animais de sepse, uma vez que o aumento de apoptose, predominantemente em órgãos linfóides, tem sido correlacionado ao surgimento da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (Rudinsky et al., 2000; Ver Elst et al., 2000; Tavernier et al., 2001; Stromme et al., 2001; Saadeddin et al., 2002).

3.1.6 Encefalopatia séptica

Com a potencialização da inflamação causada pela ativação sistêmica de receptores TLR-4, característico da falência múltipla de órgãos em modelo animal de sepse, o cérebro pode ser um dos primeiros órgãos a serem afetados associados à alta morbidade e mortalidade. Este órgão é imunologicamente ativo e influenciado por reações inflamatórias sistêmicas e respostas, tais como as que resultem de doenças sistêmicas e sepse (Elenkov et al., 2005; Iacobone et al., 2009).

A fisiopatologia da disfunção do sistema nervoso central (SNC) decorrente da sepse tem sido pouco estudada apesar da sua importância na evolução clínica dos pacientes. A encefalopatia séptica é considerada uma disfunção cerebral devido à sepse podendo ocorrer em 8-70% dos pacientes sépticos, dependendo dos critérios clínicos empregados (Sprung et al., 1990; Young et al., 1990), sendo a encefalopatia mais comum nas UTIs (Bleck et al., 1993). O conceito de encefalopatia séptica como uma entidade que não possa ser explicada pela disfunção, hipotensão, ou pela hipóxia hepática ou renal, é relativamente nova, porém está claro que a sepse e suas reações podem ser associadas a um largo espectro de danos e disfunções cerebrais (Papadopoulos et al., 2000).

Diversos fatores de risco têm sido descritos para a ocorrência de encefalopatia séptica e podem ser categorizados como: a) condição pré-existente do paciente (como p. ex. idade, história de depressão, doença hepática, doença renal); b) condição aguda do paciente (como p.ex. overdose de drogas, febre) e c) fatores iatrogênicos ou ambientais (como p.ex. uso de sedativos, alimentação enteral, cateter venoso central) (Ebersoldt et al., 2007). Em casos fatais, têm-se demonstrado proliferação de astrócitos e microglia

no córtex, infartos cerebrais, púrpura cerebral, múltiplas hemorragias pequenas na substância branca e disseminação de microabscessos (Jackson et al., 1985). Nos sobreviventes se tem demonstrado redução do fluxo sanguíneo cerebral, disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) e alteração de neurotransmissores (Bowton et al., 1989; Descamps et al., 2003).

Além destas manifestações neurológicas agudas observadas em pacientes criticamente enfermos, demonstra-se que sobreviventes da terapia intensiva, incluindo pacientes sépticos, apresentam disfunções cognitivas de longo prazo (Angus et al., 2001a; Hough e Curtis, 2005; Winters et al., 2010). O dano cognitivo em longo prazo vem sendo relatado como uma sequela de sepse (Gunther et al., 2012; Semmler et al., 2013). Estudos mostraram que a prevalência de dano cognitivo moderado a grave é 10,6% maior em pacientes sobreviventes de sepse grave (Iwashyna et al., 2010). Semmler e colaboradores (2007) demonstraram em animais sobreviventes de sepse perda neuronal no hipocampo e sub-regiões do córtex pré-frontal e inervação colinérgica reduzida de áreas corticais, resultando em relevantes consequências funcionais, tais como, a perda de memória, uma alteração semelhante ao observado em pacientes com doença de Alzheimer. Assim como para a encefalopatia, os mecanismos associados a estas alterações não são bem entendidos, mas podem incluir inflamação, estresse oxidativo e disfunção energética cerebral (Messaris et al., 2004).

3.1.6.1 Teste comportamental SHIRPA

O protocolo semi-quantitativo SHIRPA (*SmithKline/ Harwell/ ImperialCollege/ RoyalHospital/ Phenotype Assessment*) representa ferramenta desenvolvida no final da década de 90 por importantes centros de pesquisa britânicos associados a uma companhia farmacêutica e inclui 40 diferentes testes em 3 classes amplas (estágios) de rastreamento de funções neurológicas básicas, com diferentes graus de complexidade e especialização. Apesar de bastante rica e ampla na abordagem das diferentes modalidades do exame neurológico, o protocolo SHIRPA é ferramenta qualitativa e baseada em gradações por escores, o que torna o significado real de cada teste aplicado examinador-dependente e passível apenas de comparação com outros animais para validação (Rogers et al., 1997; Rogers et al., 2001; Hatcher et al., 2001; Masuya et al., 2005; Pinto et al., 2013).

Estudos utilizando o modelo experimental de sepse por ligação e perfuração cecal (CLP) vem utilizando o teste comportamental SHIRPA para a avaliação do estado neurológico destes animais (Comim et al., 2011a; Chavan et al., 2012).

3.1.6.2 S100 β

A busca de marcadores periféricos gerais e específicos de lesão cerebral tem aumentado ao longo dos últimos 10 anos. Um destes marcadores é o S100 β , que é uma

proteína de ligação de cálcio, expressa predominantemente por astrócitos no cérebro dos vertebrados (Donato, 2001).

A família das proteínas S100 modula uma variedade de funções intracelulares, incluindo homeostase do cálcio, organização citoesquelética, progressão do ciclo celular, crescimento e diferenciação celular (Donato, 2001; Heizmann et al., 2002). Apesar de suas funções intracelulares, a liberação das S100s acontecem a partir de diferentes tipos celulares durante processos inflamatórios, podendo ser utilizadas como marcadores de atividade na doença (Frosch et al., 2000; Foell e Roth, 2004), sendo a S100 β associada a inflamação no SNC (Foell et al., 2007). Estes eventos celulares são importantes na progressão da neurodegeneração (Tan et al., 2009). A resposta inata da glia ao dano, patógeno ou estímulo de ativação de maneira geral conduziria a desfechos benéficos, como a fagocitose ou produção de fatores de reparação ou proteção. No entanto, quando a ação da microglia é mantida gera superprodução de mediadores pró-inflamatórios alterando a homeostase, o que resulta em progressão da doença exacerbando a influência de fatores que interferem na disfunção neuronal e na progressão da neuropatologia (Lue et al., 2001; van Eldik et al., 2007; Fang et al., 2010).

Níveis elevados de S100 β refletem com precisão a presença de condições neuropatológicas incluindo lesões traumáticas na cabeça (Biberthaler et al., 2006; Blyth et al., 2009; Ruan et al., 2009), transtornos psiquiátricos (Rothermundt et al., 2004; Andreazza et al., 2007), insultos vasculares cerebrais (Missler et al., 1997) e doenças neurodegenerativas (Griffin et al., 1989; Peskind et al., 2001; Netto et al., 2006), enquanto que os níveis normais excluem de forma confiável a maioria das patologia do SNC (Ingebrigtsen et al., 1999; Biberthaler et al., 2001; Biberthaler et al. 2006). O

aumento da S100 β tem associação direta com a alta mortalidade e é um preditor independente de sobrevida na terapia intensiva (Iacobone et al., 2009).

3.1.7 Ligação e perfuração cecal

Estudos de sepse em humanos são difíceis devido à severidade da doença, a necessidade de intervenções terapêuticas imediatas e a heterogeneidade dos pacientes. Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para os estudos dos aspectos fisiopatológicos e das consequências sistêmicas da sepse, assim como para a investigação de agentes potencialmente terapêuticos e seus mecanismos de ação. Para esta proposta, deve-se utilizar um modelo animal que reproduza a vasodilatação, hipotensão, aumento no débito cardíaco, resposta ao tratamento e mortalidade vistos em pacientes sépticos. Utiliza-se para tal finalidade o modelo de sepse abdominal, sepse cutânea, sepse induzida pela administração de LPS ou TNF. Porém os modelos que induzem peritonite são mais amplamente utilizados. A peritonite pode ser induzida por inoculação direta de bactérias ou conteúdo fecal na cavidade peritoneal e, entretanto o modelo mais aceito na literatura, e que parece simular mais adequadamente o quadro clínico de sepse é chamado de CLP (Deitch, 2005; Hubbard et al., 2005; Rocha et al., 2006; Rittirsch et al., 2007).

A CLP baseia-se na ligação do ceco logo abaixo da válvula íleo cecal, perfuração do ceco com tamanho padronizado e liberação do conteúdo fecal para a cavidade peritoneal, conforme classicamente descrito por Wichterman e colaboradores (Wichterman et al., 1980). Desta maneira além da peritonite se induz isquemia

mesentérica simulando as grandes síndromes clínicas de sepse abdominal (p. ex. apendicite, isquemia mesentérica) (Hollenberg et al., 2001).

Representa vantagens como relativa simplicidade, reprodutibilidade e possibilidade de controlar o grau de contaminação bacteriana na cavidade peritoneal, e consequentemente, a mortalidade, pela mudança do tamanho da agulha e/ou número de perfurações realizadas no ceco. Em contrapartida, variabilidades na mortalidade podem ser encontradas, mesmo quando protocolos iguais são usados, devido a fatores aos quais, na maioria das vezes, não são considerados como, por exemplo, diferenças no tamanho da incisão na pele e músculo, no comprimento ligado do ceco e volume de conteúdo fecal extravasado para a cavidade peritoneal (Deitch, 2005; Hubbard et al., 2005; Rocha et al., 2006; Rittirsch et al., 2007). Por isso, a padronização do procedimento de indução de sepse polimicrobiana por CLP tem relevante importância na consistência e reprodutibilidade dos resultados.

3.2 Interações entre sistema nervoso central e sistema imunológico

A ideia da existência de interações entre os sistemas nervoso e imune é extremamente antiga. Aristóteles, afirmava que a “psique” (alma) e o corpo reagem complementarmente um com o outro; para ele, uma mudança no estado da psique produzia uma mudança na estrutura do corpo e, inversamente, uma mudança na estrutura do corpo produzia uma mudança na estrutura da psique (Conti, 2000; Besedovsky e Del Rey, 2007).

Blalock (1984) propôs que o sistema imune, além da sua função na defesa do organismo, teria uma função de órgão sensorial que serviria para detectar estímulos que não poderiam ser ouvidos, vistos, cheirados, degustados ou sentidos. Ele sugeriu que o sistema imune poderia funcionar como um “Sexto Sentido” capaz de detectar e levar o organismo a responder a substâncias estranhas tais como patógenos, tumores, alérgenos. Por ter grande sensibilidade e especificidade sabe-se hoje que esse “órgão sensorial” mobiliza o corpo a responder prontamente a esses desafios; esta capacidade sensorial tem seu fundamento nas bases moleculares propostas para a análise das interações entre os sistemas imune e neuroendócrino uma vez que os leucócitos individualmente não estão diretamente conectados ao SNC (Blalock, 2005).

Estudos realizados pelo grupo de Tracey e colaboradores contribuíram enormemente para o conhecimento nessa área (Rangwala et al., 1997; Tracey, 2002; Wang et al., 2004; Pavlov et al., 2006; Tracey, 2007; Sloan et al., 2007; Rosas-Ballina e Tracey, 2009; Tracey, 2009; Huston e Tracey, 2011). Descreveram inicialmente que a ativação do nervo vago (elétrica ou com uso de agonistas colinérgicos) reduz a resposta inflamatória em modelos experimentais de sepse; em trabalhos subsequentes, esse grupo cunhou a teoria do “Reflexo Inflamatório”. Como todo arco reflexo mediado pelo sistema nervoso, é composto por uma via de informação aferente, áreas de integração no SNC e uma efetora eferente. De forma breve, verificou-se que mediadores inflamatórios (citocinas) produzidos em tecidos periféricos “notificam” o SNC da presença de inflamação no organismo, por ação direta em áreas centrais ou por estimulação de aferências do nervo vago; nas áreas centrais ocorre a integração dos sinais e desencadeamento da resposta inflamatória global, incluindo a ativação da via eferente do parassimpático, mediado em especial, pelo nervo vago; o nervo vago, cujo neurotransmissor é acetilcolina (ACh) (via colinérgica), inerva vários componentes ou

órgãos do sistema imunológico (sistema retículo endotelial), como linfonodos, fígado e baço; a ativação do vago leva a redução da produção de citocinas pelo baço de forma significativa, e como consequência uma redução intensa da resposta inflamatória (em modelos de inflamação séptica e asséptica). No reflexo inflamatório, o vago é o elemento mais importante no braço eferente.

No entanto, pouco se sabe sobre a regulação do cérebro por vias eferentes do vago baseada nos nervosos colinérgicos anti-inflamatórios. Os componentes anatômicos desta via incluem os neurônios pré-ganglionares originários do núcleo motor dorsal dos neurônios vago e pós-ganglionares localizados nos gânglios do plexo mesentérico celíaco superior, que projeta para o baço através do nervo esplênico (Rosas-Ballina et al., 2008).

Estudos em animais indicam que o neurotransmissor liberado pelo nervo vago, a ACh, é capaz de inibir a produção de citocinas pelos macrófagos localizados no baço, ligando-se aos receptores do tipo nicotínico, mais especificamente, receptores α -7 nicotínicos de ACh (α 7nAChR) (Pavlov et al., 2009; Olofsson et al., 2012).

Ainda que ambos os receptores para ACh, nicotínicos e muscarínicos, sejam encontrados nos macrófagos, somente os α 7nAChR exercem função relevante na via anti-inflamatória colinérgica (Wang et al., 2003; Pavlov et al., 2006; Bencherif et al., 2011). Pesquisas com camundongos knockout para o α 7nAChR mostraram claramente, in vivo, o importante papel dessa subunidade na via anti-inflamatória colinérgica: esses animais são mais sensíveis a estímulos inflamatórios porque liberam maiores quantidades de TNF- α , IL-1, IL-6 no sangue quando comparados com animais selvagens; não se observa significativa redução da produção de citocinas no baço e no fígado (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, e HMGB1) por meio da estimulação elétrica do nervo vago; macrófagos peritoniais isolados desses animais não respondem à ACh nem à

nicotina, e quando estimulados, continuam a produzir TNF- α mesmo na presença desses ligantes (Wang et al., 2004; Rosas-Ballina et al., 2008).

3.3 Acetilcolina

A ACh é o neurotransmissor das junções neuromusculares, sistema nervoso autônomo e alguns neurônios do SNC. No sistema nervoso autônomo, é o transmissor das fibras pré e pós-ganglionares parassimpáticas e fibras pré-ganglionares simpáticas, controlando inúmeras funções mantenedoras da homeostase como a contração da musculatura gástrica, ritmo cardíaco e secreção de alguns hormônios. No SNC, a ACh parece estar envolvida em processos cognitivos como atenção, memória, aprendizado e vigília (Gold, 2003; Pepeu e Giovannini, 2004; Sarter et al., 2005).

A biossíntese da ACh ocorre no citosol do terminal dos neurônios colinérgicos onde a colina é acetilada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) utilizando acetil-CoA como doador de grupo acetil (Scagnelli et al., 1991; Ribeiro et al., 2006).

Liberação eficiente de ACh a partir de terminações nervosas depende da sua armazenagem em vesículas sinápticas, uma etapa dependente da atividade de um transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). O VACHT é uma glicoproteína de vesículas sinápticas que apresenta 12 domínios transmembrana e possui homologia com os transportadores vesiculares de monoaminas (Parsons et al., 1993; Erickson et al., 1994; Roghani et al., 1994; Reimer et al., 1998).

Após ser liberada no terminal sináptico, a ACh interage com seus receptores e é rapidamente degradada pela acetilcolinesterase (AChE), a colina é novamente recaptada

para o terminal pré-sináptico pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1). A inativação da acetilcolina é realizada pela ação da AChE. Esta enzima catalisa a conversão da molécula de acetilcolina em acetato e colina (Yamamura e Snyder, 1973; Collier e Ilson, 1977; Rand, 2007; Ribeiro et al., 2006).

A fim de estudar o papel da acetilcolina no desenvolvimento de alterações neurológicas e imunológicas em fase tardia após a sepse, foram utilizadas duas estratégias: aumentar ou diminuir os níveis de ACh, utilizando respectivamente: donepezila e animais *knockdown* para o VACHT (VACHT KD).

3.3.1 Donepezila

Donepezila é quimicamente conhecido como cloridrato de ($\pm$)-2,3-diidro-5,6-dimetoxi-2-[[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]metil]-1H-inden-1-ona, sua fórmula molecular é $C_{24}H_{29}NO_3$ HCl, e seu peso molecular é 415,96. Foi a segunda medicação aprovada nos Estados Unidos para o tratamento de Alzheimer (Rogers et al., 1996).

Seus efeitos clínicos são resultantes da inibição da AChE, o que leva ao aumento da concentração extracelular de acetilcolina no córtex cerebral e hipocampo (Giacobini, 1993; Francis et al., 1999; Wilkinson, 1999). É um inibidor reversível de longa duração, conhecido para melhorar a memória e a função cognitiva (Hansen et al., 2008). Estudos demonstraram que o uso crônico da donepezila modula positivamente receptores colinérgicos nicotínicos, e tem capacidade neuroprotetora (Takada-Takatori et al., 2008).

Os eventos adversos mais comuns da donepezila, bem como o de outros inibidores da colinesterase, são náuseas, vômitos, diarreia e tontura, todos os quais são os sintomas ligados à hiperestimulação colinérgica (Rogers et al., 1998a; Burns et al., 1999). Estes efeitos são dose-relacionados e dependerá em grande parte das concentrações plasmáticas (Imbimbo, 2001). Quando a donepezila é administrada por via oral, ela é bem absorvida e atinge a concentração máxima no plasma em 3-4 horas (Jann et al., 2002).

A donepezila vem sido utilizada em diversos ensaios clínicos, demonstrando melhorar a função cognitiva em pacientes para uma ampla gama de gravidade Alzheimer, de muito leve, moderada a grave, mostrando também um possível efeito anti-inflamatório (Rogers et al., 1996; Rogers et al., 1998b; Seltzer et al., 2004; Reale et al., 2005; Winblad et al., 2006; Tsuno, 2009).

Diversos estudos em animais utilizaram donepezila para hiperestimular a transmissão colinérgica e apresentaram uma melhora na neurogênese hipocampal e na função cognitiva em roedores, mostrando seu efeito anti-inflamatório (Kaneko et al., 2006; Kotani et al., 2008; Narimatsu et al., 2009; Inanaga et al., 2010; Bruel-Jungerman et al., 2011; Itou et al., 2011; Yu et al., 2015).

3.3.2 VACHT

Em 2006, Prado e colaboradores caracterizaram um camundongo geneticamente modificado com diminuição (*knockdown*) na expressão do gene que codifica a proteína VACHT. O gene da proteína VACHT fica no primeiro íntron do gene da proteína ChAT. É importante ressaltar, entretanto, que a queda na transcrição de mRNA (RNA

mensageiro) foi específica para a VACHT, não havendo alteração na expressão nos níveis de mRNA para a ChAT.

A análise do córtex cerebral, estriado, medula espinhal e hipocampo revelou que animais VACHT KD homozigoto possuem uma diminuição de 65-70% na expressão da VACHT, em relação aos animais VACHT *wild type* (WT). A redução na expressão da VACHT teve consequência direta sobre a quantidade de ACh liberada no sistema nervoso central (Prado et al., 2006; Lima et al., 2010; Pinheiro et al., 2015).

Diversos estudos vêm utilizando os animais VACHT KD como uma forma de diminuir a ACh liberada na fenda e consequentemente diminuir a transmissão colinérgica (Guidine et al., 2008; Lima et al., 2010; Capettini et al., 2011; Schmid et al., 2011; Roy et al., 2012; Rodrigues et al., 2013; Pinheiro et al., 2015).

4. Materiais e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c machos e camundongos homozigotos mutantes VAcHT KD e seus WTs, com 8 semanas, pesando 20-25 g, livres de patógenos específicos (SPF) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Mutantes VAcHT KD utilizados neste estudo foram geradas por ratos heterozigotos inter cruzados. Estes camundongos mostraram uma redução de aproximadamente 65% nos níveis de VAcHT no sistema nervoso e também em outros órgãos (Pinheiro et al., 2015), que está correlacionado com a redução dos níveis de ACh (Prado et al., 2006; Lima et al., 2010).

Os camundongos foram mantidos em gaiolas, em local com temperatura e ciclo de luz controlado, recebendo água e comida *ad libitum*, e permaneceram durante o experimento no Biotério de Manutenção do LIM 51 – Disciplina de Emergências clínicas, sobre responsabilidade do biólogo Antônio dos Santos Filho.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório publicado pelo *US National Institutes of Health*. Nosso projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Protocolo de Pesquisa nº 289/12.

4.2 Experimentos

Este estudo foi dividido em três: Experimento Agudo, Experimento Crônico e Efeito da acetilcolina na evolução tardia da sepse.

4.2.1 Experimento Agudo

A fim de verificar o efeito da gravidade da sepse na interação entre SNC e sistema imunológico os camundongos Balb/c foram submetidos ao procedimento cirúrgico para induzir a sepse em diferentes gravidades (grave, moderado e leve), 6 horas após foi realizado o teste comportamental SHIRPA e logo após os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono (CO₂). O sangue foi colhido por punção cardíaca, e transferidos para tubos contendo EDTA, centrifugados e o plasma foi separado, para dosagem de S100 β e de citocinas. O cérebro foi removido, hipocampo foi isolado e congelado para posterior análise de citocinas. Os baços foram colhidos em condições assépticas, pesados, divididos em dois pedaços, um no qual foi congelado para posterior análise de citocinas e o outro, pesado e mantido em gelo até o isolamento dos linfócitos.

4.2.2 Experimento Crônico

Para conhecer o efeito crônico, os camundongos Balb/c foram submetidos ao procedimento cirúrgico para induzir a sepse (leve). O teste comportamental SHIRPA foi realizado 6 horas e 15 dias após o CLP. Após os 15 dias os camundongos foram sacrificados por inalação de CO₂. O sangue foi colhido por punção cardíaca, e transferidos para tubos contendo EDTA, centrifugados e o plasma foi separado para dosagem de S100 β e citocinas. O cérebro foi removido, hipocampo foi isolado e congelado para posterior análise de citocinas. Os baços foram colhidos em condições assépticas, pesados, divididos em dois pedaços, um no qual foi congelado para posterior análise de citocinas e o outro, pesado e mantido em gelo até o isolamento dos linfócitos. Outros animais foram sacrificados para obtenção do baço para análise histológica demonstrativa.

4.2.3 Efeito da acetilcolina na evolução tardia da sepse

Com intuito de verificar o efeito da ACh no processo inflamatório em fase tardia da sepse utilizamos donepezila, um inibidor da acetilcolinesterase, e animais homozigotos mutantes VACHT KD, que possuem uma diminuição da expressão da VACHT.

Desta forma, camundongos Balb/c receberam a droga donepezila (5 mg/kg/dia, oralmente) sete dias antes do procedimento cirúrgico (CLP leve) até o dia do sacrifício.

Além disso, camundongos homozigotos mutantes VACHT KD foram submetidos ao CLP leve. O teste comportamental SHIRPA foi realizado 6 horas após o CLP. Após os 15 dias os camundongos foram sacrificados por inalação de CO₂. O sangue foi colhido por punção cardíaca, e transferidos para tubos contendo EDTA, centrifugados e o plasma foi separado para dosagem de citocinas. O cérebro foi removido, hipocampo foi isolado e congelado para posterior análise de citocinas. Os baços foram colhidos em condições assépticas, pesados, divididos em dois pedaços, um no qual foi congelado para posterior análise de citocinas e o outro, pesado e mantido em gelo até o isolamento dos linfócitos.

4.3 Ligação e perfuração cecal

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg), intraperitoneal (i.p.). CLP foi induzida como descrito previamente (Soriano et al., 2002). Sob condições assépticas, uma laparotomia mediana de 2 cm foi realizada para permitir a exposição do ceco. 50% do ceco foi ligado e subsequentemente perfurado por uma única punção com uma agulha de calibre 21 na área menos vascularizada (CLP leve), ou 100% do ceco foi ligado e subsequentemente perfurado três vezes (CLP moderado) ou cinco vezes (CLP grave), todos com uma agulha calibre 21 na área menos vascularizada. Em seguida, o ceco foi gentilmente comprimido até a extrusão de conteúdo fecal a partir dos locais de perfuração. O ceco foi devolvido para a cavidade peritoneal e a laparotomia foi fechada com fio de seda 4,0. Os camundongos sham-operados foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos, mas o ceco não

foi nem ligado, nem perfurado. Os animais foram devolvidos para suas gaiolas com livre acesso a água e comida. Os animais foram monitorados três vezes por dia, e as taxas de sobrevivência foram determinadas para 360 horas (15 dias).

4.4 SHIRPA

Os animais foram submetidos ao teste comportamental SHIRPA, que foi concebido como uma bateria de múltiplos testes usados para estudos longitudinais com diretrizes e materiais padronizados (Rogers et al., 1997), afim de avaliar a presença de alterações cerebrais. O quadro primário de SHIRPA consiste em uma série de observações, reflexos e funções básicas sensório-motoras que fornece um perfil funcional e comportamental pela observação avaliativa do desempenho individual.

O protocolo de SHIRPA foi usado para avaliar mudanças comportamentais durante o curso da sepse. Para o propósito de análise, os parâmetros individuais avaliados pelo SHIRPA foram agrupados em cinco categorias funcionais (estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autonômica, tônus e força muscular; reflexo e função sensorial) de acordo com Lackner e colaboradores (2006), determinando uma contagem global e cinco domínios de contagem. O reflexo e domínio sensorial envolvem o posicionamento visual, reflexo auricular, reflexo corneal, pressão no dedo da pata, e reflexo de endireitamento. O estado neuropsiquiátrico envolve atividade espontânea, excitação de transferência, escape ao toque, passividade posicional, medo, irritabilidade, mordida e vocalização. O comportamento motor envolve atividade locomotora, posição corporal, tremores, maneira de andar, elevação

pélvica, elevação da cauda, ondulação do tronco, manobra do arame, agarramento dos membros, e geotaxia negativa. Função autonômica envolve ritmo respiratório, fechamento da pálpebra, irritação cutânea, cor da pele, ritmo cardíaco, lacrimejação e salivação. Envolve tônus muscular e força, tônus corporal, tônus dos órgãos, e tônus abdominal.

4.5 ELISA

Utilizamos o teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para a determinação quantitativa de S100 β em plasma de camundongos, SEA567Mu (Cloud-Clone Corp). O plasma foi diluído 1:2 com PBS 0,01M.

Para a determinação níveis de citocinas 100mg dos tecidos congelados, baço e hipocampo, foram pulverizado em nitrogênio líquido. As amostras foram homogeneizadas em Triton-X100 a 150 mM de NaCl, 10 mM Tris HCl (pH 7,5), 1% de NP40, oxibato de sódio a 1%, 0,1% de SDS e inibidores de enzima proteolítica (40ug/mL de fluoreto de fenil-metil-sulfonilo 1 mM, Sigma, St , Louis, MO). Depois da separação de debris através da centrifugação durante 40 minutos a 10000 rpm, os sobrenadantes foram recolhidos e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BioRad, Hercules, CA). As amostras foram mantidas a -80° até serem analisadas.

A concentração da interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10), do baço e hipocampo do experimento agudo foram realizadas com kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

A concentração das IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, MIP-1 α , MIP-1 β e TNF- α , no baço, no hipocampo e no plasma, foi determinada pela tecnologia MilliPlex® (# MCYTOMAG-70K, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas no sistema MagPix, e os dados foram coletados pelo software Luminex xPONENT.

4.6 Histologia e Tunel

Os cortes histológicos foram utilizados para fins demonstrativos. Utilizamos camundongos balb/c submetidos ao CLP leve. Os animais foram sacrificados 15 dias após o CLP, o baço foi coletado e perfundido com formol 10%. Os baços foram então processados e, a partir destes, produziu-se cortes histológicos de 5 μ m. As lâminas contendo os cortes histológicos foram fixadas com álcool (absoluto, 95° e 70°), lavadas com água corrente e incubadas com hematoxilina de Harris por um minuto para coloração de núcleos (hematoxilina-eosina – HE). Após lavagem com água corrente, as lamínulas foram submetidas a banho com diferenciador (HCl 1%), banho de água corrente, e banho de água amoniacal (hidróxido de amônia 1%), antes de nova lavagem com água corrente. Em seguida, as lamínulas foram submetidas à segunda desidratação com álcool 95° e incubadas com uma solução de eosina + floxina (composição em mL/L: eosina 1% 111,73; floxina 1% 11,17; álcool 95° 871,51; ácido acético glacial 5,59) por 35 segundos. A seguir, as lamínulas sofreram novas desidratações com álcool (três vezes com álcool 95° e quatro com absoluto) para, finalmente, passarem por

lavagem com xilol (três vezes) e montagem em lâmina com resina sintética para fixação.

Para a avaliação das células em apoptose, utilizou-se o método de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), conforme o protocolo do kit: In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Ref. 11684817910, Version 13, Roche).

As imagens dos cortes histológicos e do ensaio de TUNEL foram adquiridas por câmera Nikon acoplada ao microscópio óptico Leica (Q500, iW, Cambridge, UK).

4.7 Isolamento de Linfócitos

A parte do baso destinada para o isolamento de linfócitos foi pesada e colocada entre duas lâminas autoclavadas fosca que foram gentilmente pressionadas em direções opostas para dissociar o tecido. Quando o tecido do órgão começou a dissociar, as lâminas foram mergulhadas em 8 mL de PBS numa placa de Petri até que apenas o tecido conjuntivo se manteve. A suspensão de células foi transferida assepticamente para um tubo de centrífuga de 15 mL estéril. As suspensões de células do baço foram centrifugadas a 400g durante 10 min e em seguida ressuspensas em PBS. Os eritrócitos foram removidos a partir de suspensões de células de baço por uma breve exposição (5-10 min) de 1 mL de Tris NH_4Cl em gelo e as células foram em seguida centrifugadas a 400g durante 10 min e ressuspensas em 3 mL de PBS.

4.8 Caracterização dos linfócitos

Foram caracterizados cinco tipos de linfócitos: Linfócitos T citotóxicos (CD3+, CD4-, CD8+); Linfócitos T auxiliares (CD3+, CD4+, CD8-); Linfócitos B (CD3+, CD19+); Células T reguladoras (CD3+, CD4+, CD25+) e Células Th17 (CD3+, IL17+). Os linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos (1×10^6 células por mL) foram incubados durante 30 min a 4°C com anti-CD3 (conjugado com FITC), anti-CD4 (conjugada com PE) e anti-CD8 (conjugada com PE/Cy5) anticorpos diluídos em PBS contendo 2% de soro fetal bovino inativado. Outros linfócitos foram incubadas durante 30 min a 4°C com os anticorpos anti-CD3 (conjugado com FITC), anti-CD4 (conjugada com PE), anti-CD19 (conjugado com PE/Cy7), anti-CD25 (conjugado com APC/Cy7) e anti-IL-17A (conjugado com APC), diluídos em tampão de permeabilização. Todas as análises foram realizadas em um citômetro de fluxo EasyCyte 8HT® (Guava, Hayward, CA) com um mínimo de 5000 eventos. As análises foram executadas em Software Express Pro® Guava.

4.9 Morte celular e ciclo celular

Após a isolamento de linfócitos, as células foram lavadas com PBS gelado e ressuspensas em tampão de ligação a 4°C. A concentração das células foi ajustada para 1×10^6 células/mL. Foi adicionado a 1,5mL desta suspensão, 100µL de Alexa Fluor 647-conjugado recombinante com Anexina V (BioLegend). As células foram incubadas por

15 minutos a temperatura ambiente no escuro. Imediatamente após o período de incubação, foi adicionado 5 µL de iodeto de propídeo (PI) e as células foram analisadas por citometria de fluxo.

Para a análise de fragmentação do DNA, 1×10^6 células foram ressuspensas em 0,2mL de tampão de Lise (0,1% de citrato de sódio e 0,1% Triton X-100) contendo 50mg/mL de PI. As células foram incubadas no escuro, a 4°C por 24 horas, e usadas para a análise de fragmentação do DNA.

No ciclo celular, 1×10^6 células foram fixadas em 1 mL de etanol 70% por 2 horas. Após este período, foram centrifugadas, lavadas em PBS e ressuspensas em 500µL de tampão contendo 0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton X-100, 50µg/mL de PI e 0,3mg/ml de RNase. As células foram incubadas por 30 minutos à 37 °C e posteriormente foram analisadas por citometria de fluxo.

4.10 Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises foram realizadas utilizando InStat Statistical Software (GraphPad, La Jolla, CA, EUA). Para análise da curva de sobrevida foi utilizado o teste de Log rank. Para análise estatística de comparação de médias do teste comportamental SHIRPA, no experimento agudo e utilizando animais VACHT KD foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com post hoc Dunns e nos experimentos crônico e com donepezila utilizou-se Mann Whitney. As comparações entre os grupos experimentais, nos experimentos agudo e VACHT KD, foram realizadas utilizando o teste ANOVA com post hoc Tukey, nos experimentos

crônico e com donepezila utilizou-se o teste t. Por fim, para as correlações utilizou-se o teste de Person. Em todos os testes foram considerados como diferença significativa os grupos que obtiverem $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Experimento Agudo

5.1.1 Análise da sobrevida nas diferentes gravidades do CLP

Os resultados da curva de sobrevida das diferentes gravidades de CLP estão apresentados na Figura 01. Uma taxa de sobrevida de 100% do grupo sham foi observada. O grupo CLP leve apresentou uma taxa de sobrevida de 90%, o grupo CLP moderado 40% e no grupo CLP grave apenas 20% de sobrevida, no final dos cinco dias até o 15º dia. A taxa de sobrevida foi significativa entre os grupos CLP moderado e CLP grave em relação ao grupo sham. Além disso, o grupo CLP grave foi diferente do grupo CLP leve.

Figura 01. Curva de sobrevida nas diferentes gravidades de CLP. Os animais foram observados por 15 dias, e a mortalidade foi registrada a cada 8h. Teste Log-rank, n=10, * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo sham e # quando comparado ao CLP leve.

5.1.2 Alterações neurológicas nas diferentes gravidades do CLP

Para avaliação das alterações neurológicas foram realizados o teste comportamental SHIRPA, a análise do biomarcador sérico, S100 β , e a dosagem de algumas citocinas no hipocampo.

Figura 02 ilustra o desempenho dos camundongos Balb/c 6h após a indução da sepse nas cinco categorias funcionais distintas: reflexo e função sensorial (A), estado neuropsiquiátrico (B), comportamento motor (C), função autônoma (D) e tônus e força muscular (E). A soma das pontuações de todas as categorias funcionais é mostrada no 'Total' (F). Houve uma diminuição no reflexo e função sensorial, estado neuropsiquiátrico e comportamento motor entre os grupos CLP moderado e CLP grave em relação ao grupo sham. Estes mesmos grupos também mostraram um aumento na função autônoma. No entanto, não mostramos diferenças significativas entre os grupos de acordo com o tônus e força muscular. Finalmente, apresentamos uma diminuição na soma das pontuações de todas as categorias funcionais nos grupos CLP moderado e CLP grave em relação ao grupo sham.

Figura 02. Teste comportamental SHIRPA 6 horas após o CLP em diferentes gravidades. Após 6h do CLP foi analisado o comportamento através do protocolo SHIRPA. Foi dividido em cinco categorias funcionais distintas: reflexo e função sensorial (A), estado neuropsiquiátrico (B), comportamento motor (C), função autônoma (D) e tônus e força muscular (E). A soma dos escores de todas as categorias está representada como “Total” (F). Os dados estão apresentados com média $\pm$ EPM, 10 animais por grupo. Kruskal-Wallis test e post hoc Dunns, * $p < 0,05$ quando comparado com sham.

A Figura 03 mostra que os níveis plasmáticos de S100 β foram significativamente aumentados nos grupos CLP moderado e CLP grave em relação ao grupo sham e ao grupo CLP leve.

Figura 03. Os níveis plasmáticos de S100β 6 horas após o CLP. Após 6 horas do CLP os animais foram sacrificados, o plasma foi removido e os níveis de S100β foram medidos por ELISA. Os dados são apresentados como média ± EPM, dez camundongos por grupo. ANOVA e post hoc Tukey, * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo sham e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CLP leve.

Quantificamos as citocinas: IL-6, IL-1β, TNF-α e IL-10 no hipocampo. Estas citocinas fornecem um perfil inflamatório após a CLP nos tecidos. Porém no hipocampo (Figura 04) não observamos nenhuma diferença estatística em nenhuma das citocinas quantificadas.

Figura 04. Níveis de citocinas no hipocampo 6 horas após o CLP. Após 6 horas do CLP os animais foram sacrificados, o cérebro foi removido, o hipocampo isolado e os níveis de IL-6 (A), IL-1β (B), TNF-α (C) e IL-10 (D) foram medidos por ELISA. Os dados são apresentados como média ± EPM, dez animais por grupo. ANOVA e post hoc Tukey.

5.1.3 Perfil das células no baço de diferentes gravidades do CLP

Os baços dos camundongos foram removidos 6 horas após o CLP, os pesos foram registrados na Figura 05 (A), não apresentando diferença significativa entre os grupos. A Figura 05 (B) mostra a relação entre o peso do baço/ peso do corpo, que também não foi observado nenhuma diferença significativa. Os baços dos camundongos foram processados e o número de células foi quantificado por citometria de fluxo, mostrado na Figura 05 (C), onde não podemos verificar diferença estatística entre os grupos.

Figura 05. Peso do baço 6 horas após o CLP. Após 6 horas do CLP os animais foram sacrificados, o baço foi coletado, pesado e por citometria de fluxo o número de células foi quantificado. (A) peso do baço (B) relação do peso do baço/peso do corpo (C) número de células no baço. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM, dez animais por grupo. ANOVA e post hoc Tukey.

Os linfócitos foram diferenciados e as contagens no baço dos animais estão apresentadas na Figura 06: linfócito T citotóxico (A); linfócitos T auxiliares (B); linfócitos B (C); células T reguladoras (D) e células Th17 (E). Não houve diferença significativa em qualquer grupo em qualquer tipo de linfócito.

Na Figura 07, observamos que a correlação entre os linfócitos com o biomarcador de encefalopatia séptica o S100 β foi uma correlação significativa e positiva em linfócito T citotóxico e linfócito T auxiliar.

Figura 06. Caracterização de linfócitos no baço 6 horas após o CLP. Após 6 horas do CLP os animais foram sacrificados, o baço foi removido e caracterizado cinco tipos de linfócitos por citometria de fluxo: linfócito T citotóxico (A); linfócitos T auxiliares (B); linfócitos B (C); células T reguladoras (D) e células Th17 (E). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM, dez animais por grupo. ANOVA e post hoc Tukey.

Figura 07. Correlação entre os linfócitos e o S100β 6 horas após o CLP. Linfócito T citotóxico (A); linfócitos T auxiliares (B); linfócitos B (C); células T reguladoras (D), células Th17 (E). Pearson, $*p < 0,05$.

Podemos observar nas citocinas quantificadas no baço (Figura 08) um aumento significativo na quantidade de IL-6 após a sepse no grupo CLP grave em relação ao grupo sham e CLP leve. O nível de IL-1β aumentou significativamente no grupo CLP moderado e CLP grave quando comparados ao grupo sham e CLP leve. Os níveis de TNF-α não diferenciaram. No entanto, o nível de IL-10, foi aumentado

significativamente no CLP moderado em relação ao sham e no CLP grave em comparação com sham e CLP leve.

Figura 08. Níveis de citocinas no baço 6 horas após o CLP. Após 6 horas do CLP os animais foram sacrificados, o baço foi removido e os níveis de IL-6 (A), IL-1β (B), TNF-α (C) e IL-10 (D) foram medidos por ELISA. Os dados são apresentados como média ± EPM, dez animais por grupo. ANOVA e post hoc Tukey, *p < 0,05 quando comparado com o grupo sham e #p < 0,05 quando comparado com o grupo CLP leve.

5.1.4 Perfil inflamatório nas diferentes gravidades do CLP

O perfil inflamatório nas diferentes gravidades do CLP foi observado através da quantificação de algumas citocinas no plasma (Figura 09). Relatamos um aumento no grupo CLP grave em relação ao sham, CLP leve e moderado em IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p40, MIP-1β e TNF-α. Um aumento no grupo CLP grave em relação ao sham e CLP leve foi observado em IL-4 e MIP-1α. O grupo CLP moderado foi aumentado em relação ao sham e CLP leve em IL-6 e em relação apenas ao sham em MIP-1α e MIP-1β.

Figura 09. Níveis de citocinas no plasma 6 horas após o CLP. Após 6 horas do CLP os animais foram sacrificados, o plasma isolado e os níveis de IL-1α (A), IL-1β (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-10 (E), IL-12p40 (F), IL-12p70 (G), MIP-1α (H), MIP-1β (I) e TNF-α (J), foram dosados por tecnologia MilliPlex®. Os dados são apresentados como média ± EPM, cinco animais por grupo. ANOVA e post hoc Tukey, *p<0,05 quando comparado com o grupo sham, #p<0,05 quando comparado com o grupo CLP leve e δp<0,05 quando comparado com o grupo CLP moderado.

5.2 Experimento Crônico

5.2.1 Alterações neurológicas em sobreviventes do CLP

Em relação ao teste comportamental SHIRPA, seis horas após a indução da sepse, observamos na Figura 10 uma diminuição entre os grupos CLP leve em relação ao grupo sham no reflexo e função sensorial, estado neuropsiquiátrico, comportamento

motor e o score total. Um aumento na função autônoma, também foi observado. No entanto, a categoria tônus e força muscular não houve diferença estatística.

A Figura 11 ilustra o teste comportamental SHIRPA 15 dias após a indução da sepse. Observamos que houve apenas uma diminuição significativa no reflexo e função sensorial no grupo CLP leve em relação ao grupo sham.

Figura 10. Teste comportamental SHIRPA 6 horas após o CLP. Após 6h do CLP foi analisado o comportamento através do protocolo SHIRPA. Foi dividido em cinco categorias funcionais distintas: reflexo e função sensorial (A), estado neuropsiquiátrico (B), comportamento motor (C), função autônoma (D) e tônus e força muscular (E). A soma dos escores de todas as categorias está representada como “Total” (F). Os dados estão apresentados com média $\pm$ EPM, 10 animais por grupo. Mann Whitney, * $p < 0,05$.

Figura 11. Teste comportamental SHIRPA 15 dias após o CLP. Após 15 dias do CLP foi analisado o comportamento através do protocolo SHIRPA. Foi dividido em cinco categorias funcionais distintas: reflexo e função sensorial (A), estado neuropsiquiátrico (B), comportamento motor (C), função autônoma (D) e tônus e força muscular (E). A soma dos escores de todas as categorias está representada como “Total” (F). Os dados estão apresentados com média $\pm$ EPM, 10 animais por grupo. Mann Whitney, * $p < 0,05$.

Os níveis plasmáticos de S100 β 15 dias após o CLP podem ser observados na Figura 12. Mostramos que o grupo CLP encontra-se aumentado quando comparado com o sham.

Figura 12. Os níveis plasmáticos de S100β 15 dias após o CLP. Após 15 dias do CLP os animais foram sacrificados, o plasma foi removido e os níveis de S100β foram medidos por ELISA. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM, dez camundongos por grupo. Teste t, * $p < 0,05$.

Nós quantificamos as citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, MIP-1 α , MIP-1 β e TNF- α no hipocampo (Tabela 01) e observamos que o grupo CLP foi significativamente aumentado somente em IL-6 quando comparado com o grupo sham.

Tabela 01. Citocinas no hipocampo 15 dias após CLP.

Citocinas	Sham	CLP leve
IL-1 α	0,33 ($\pm 0,33$)	0,22 ($\pm 0,14$)
IL-1 β	0,14 ($\pm 0,06$)	0,14 ($\pm 0,07$)
IL-4	0,11 ($\pm 0,01$)	0,15 ($\pm 0,03$)
IL-6	0,03 ($\pm 0,006$)	0,07 ($\pm 0,006$)*
IL-10	1,22 ($\pm 1,02$)	0,18 ($\pm 0,06$)
IL-12p40	0,07 ($\pm 0,03$)	0,04 ($\pm 0,02$)
IL-12p70	0,01 ($\pm 0,003$)	0,01 ($\pm 0,007$)
MIP-1 α	0,48 ($\pm 0,22$)	0,19 ($\pm 0,19$)
MIP-1 β	0,48 ($\pm 0,22$)	0,19 ($\pm 0,19$)
TNF- α	0,08 ($\pm 0,01$)	0,07 ($\pm 0,01$)

Nota: Os dados são apresentados com média $\pm$ EPM, cinco animais por grupo. Teste t, * $p < 0,05$.

5.2.2 Perfil das células do baço em sobreviventes do CLP

Nós observamos um aumento do peso do baço dos camundongos CLP leve 15 dias após o CLP (Figura 13 A). A relação entre o peso do baço/ peso do corpo também foi aumentada significativamente (Figura 13B) assim como o número de células que foi quantificada por citometria de fluxo (Figura 13C). A Figura 13D ilustra o tamanho do baço obtido.

Figura 13. Peso do baço 15 dias após o CLP. Após 15 dias do CLP os animais foram sacrificados, o baço foi coletado, pesado e por citometria de fluxo o número de células foi quantificado. (A) peso do baço, (B) relação do peso do baço/peso do corpo, (C) número de células no baço e (D) imagem do baço. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM, dez animais por grupo. Teste t, * $p < 0,05$.

Na Figura 14 está representado o corte histológico do baço dos camundongos 15 dias após a indução da sepse por CLP. Observamos na imagem (A) um baço de um camundongo CLP com a polpa branca bastante aumentada, muitos linfócitos presentes, quando comparado com o baço do camundongo sham (B). Na imagem (C) mostramos a

presença de megacariócitos no baço do CLP, diferentemente do sham, imagem (D). Nas imagens (E) CLP e (F) sham, observamos a marcação por Tunel, mostrando que a apoptose esta mais evidente nos animais CLP.

Figura 14. Corte histológico do baço, 15 dias após o CLP. Corte histológico corado ao HE: (A) CLP aumento 200x, (B) sham aumento 200x, (C) CLP aumento 400x, (D) sham aumento 400x. Marcação de apoptose ao método de TUNEL: (E) CLP aumento 400x, (F) sham aumento 400x. As numerações representam: 1- Polpa branca; 2- Polpa vermelha; 3- Megacariócitos; 4- células em apoptose.

A caracterização dos linfócitos no baço de camundongos 15 dias após o CLP está apresentada na Figura 15. Observamos um aumento significativo em linfócito T citotóxico, linfócitos T auxiliares, linfócitos B e células T reguladoras nos grupos CLP leve comparados ao sham. Não houve diferença significativa em células Th17.

A correlação dos linfócitos com o biomarcador de encefalopatia séptica, o S100 β , pode ser observado na Figura 16. Mostramos uma correlação significativa e positiva em linfócito t citotóxico e linfócito T auxiliar. Uma correlação significativa e negativa em Th17 também pode ser observada.

Figura 15. Caracterização de linfócitos no baço 15 dias após o CLP. Após 15 dias do CLP os animais foram sacrificados, o baço foi removido e caracterizado cinco tipos de linfócitos por citometria de fluxo: linfócito T citotóxico (A); linfócitos T auxiliares (B); linfócitos B (C); células T reguladoras (D) e células Th17 (E). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM, dez animais por grupo. Teste t, *p<0,05.

Figura 16. Correlação entre os linfócitos e o S100β 15 dias após o CLP. Linfócito T citotóxico (A); linfócitos T auxiliares (B); linfócitos B (C); células T reguladoras (D) e células Th17 (E). Pearson, * $p < 0,05$.

A morte celular está apresentada na Figura 17: células em apoptose inicial (Anexina +) (A), células em necrose (PI +) (B) e apoptose tardia (fragmentação do DNA) (C). Observamos um aumento significativo da morte celular, tanto por apoptose inicial, necrose como por apoptose tardia no grupo CLP leve em relação ao grupo sham. A correlação entre a morte celular e o S100 β é mostrada na Figura 18 e observamos uma correlação significativa e positiva em apoptose inicial, necrose e apoptose tardia.

Figura 17. Morte celular no baço 15 dias após o CLP. Após 15 dias do CLP os animais foram sacrificados, o baço foi removido e os níveis de Anexina + (A), PI + (B) e fragmentação do DNA (C) foram quantificados por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM, dez animais por grupo. Teste t, * $p < 0,05$.

Figura 18. Correlação entre a morte celular e o S100 β 15 dias após o CLP. Anexina + (A), PI + (B) e fragmentação do DNA (C). Pearson, * $p < 0,05$.

O ciclo celular das células do baço pode ser observado na Figura 19. Observamos que as células do CLP na fase G1 encontram-se diminuídas, e na fase S e G2 aumentadas.

Figura 19. Ciclo celular no baço 15 dias após o CLP. Após 15 dias do CLP os animais foram sacrificados, o baço foi removido e as fases do ciclo celular (G1, S e G2) foram quantificadas por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM, dez animais por grupo. Teste t, * $p < 0,05$.

Em relação às citocinas no baço, o grupo CLP leve (Tabela 02) apresentou um significativo aumento em IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p40, MIP-1 α e TNF- α quando comparado ao grupo sham.

Tabela 02. Citocinas no baço 15 dias após CLP.

Citocinas	Sham	CLP leve
IL-1 α	3,27 ($\pm$ 1,44)	10,69 ($\pm$ 3,95)
IL-1 β	0,85 ($\pm$ 0,18)	1,89 ($\pm$ 0,28)*
IL-4	0,47 ($\pm$ 0,10)	0,52 ($\pm$ 0,03)
IL-6	0,80 ($\pm$ 0,17)	5,93 ($\pm$ 0,88)*
IL-10	0,61 ($\pm$ 0,04)	6,39 ($\pm$ 1,61)*
IL-12p40	0,48 ($\pm$ 0,13)	15,25 ($\pm$ 0,40)*
IL-12p70	0,14 ($\pm$ 0,05)	3,27 ($\pm$ 1,37)
MIP-1 α	2,31 ($\pm$ 0,59)	15,06 ($\pm$ 4,17)*
MIP-1 β	17,42 ($\pm$ 3,07)	25,01 ($\pm$ 7,25)
TNF- α	0,35 ($\pm$ 0,07)	1,06 ($\pm$ 0,10)*

Nota: Os dados são apresentados com média $\pm$ EPM, cinco animais por grupo. Teste t, * $p < 0,05$.

5.2.3 Perfil inflamatório em sobreviventes do CLP

Abaixo, nós apresentamos os resultados de níveis de IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, MIP-1 α , MIP-1 β e TNF- α no plasma (Tabela 03). O grupo CLP leve mostrou um significativo aumento em IL-6 e uma diminuição em MIP-1 β quando comparados com o grupo sham.

Tabela 03. Citocinas no plasma 15 dias após CLP.

Citocinas	Sham	CLP leve
IL-1 α	0,81 ($\pm$ 0,40)	0,48 ($\pm$ 0,19)
IL-1 β	0,85 ($\pm$ 0,11)	0,65 ($\pm$ 0,05)
IL-4	0,66 ($\pm$ 0,02)	0,58 ($\pm$ 0,03)
IL-6	2,26 ($\pm$ 0,47)	31,97 ($\pm$ 7,31)*
IL-10	2,16 ($\pm$ 0,17)	1,96 ($\pm$ 0,28)
IL-12p40	1,79 ($\pm$ 0,30)	1,25 ($\pm$ 0,25)
IL-12p70	1,46 ($\pm$ 0,13)	1,10 ($\pm$ 0,22)
MIP-1 α	5,05 ($\pm$ 3,26)	0,0 ($\pm$ 0,0)
MIP-1 β	11,38 ($\pm$ 4,12)	0,0 ($\pm$ 0,0)*
TNF- α	1,83 ($\pm$ 0,16)	2,00 ($\pm$ 0,12)

Nota: Os dados são apresentados com média $\pm$ EPM, cinco animais por grupo. Teste t, *p<0,05.

5.3 Efeito da acetilcolina na evolução tardia da sepse

5.3.1 Análise da sobrevida nos animais com donepezila e VACHT KD

A curva de sobrevida dos animais que receberam donepezila está apresentada na Figura 20, e a dos animais VACHT KD, na Figura 21. Uma taxa de sobrevida de 100% do grupo sham foi observada em todos os animais. No experimento donepezila os animais CLP obtiveram uma taxa de sobrevida de 70% no final do 3º dia até o 15º dia. No experimento utilizando animais VACHT KD observamos que a taxa de sobrevida dos animais WT CLP foi de 55% e dos animais VACHT KD de 52% após 48 horas do CLP, sendo diferente estatisticamente em relação aos grupos WT sham e VACHT KD sham.

Figura 20. Curva de sobrevida após CLP no experimento com donepezila. Os animais foram observados por 15 dias e a mortalidade foi registrada a cada 8h. Teste Log-rank, n=10.

Figura 21. Curva de sobrevivência após CLP no experimento VACHT KD. Os animais foram observados por 15 dias e a mortalidade foi registrada a cada 8h. Teste Log-rank, n=8, *p<0,05 quando comparado com o grupo WT sham e #p<0,05 quando comparado com o grupo VACHT KD sham.

5.3.2 Alterações neurológicas nos animais com donepezila e VACHT KD

A Figura 22 ilustra o desempenho do teste comportamental SHIRPA 6 horas após o CLP nos camundongos Balb/c que receberam donepezila. Não mostramos nenhuma alteração significativa nas cinco categorias funcionais distintas. No entanto, na Figura 23, uma diminuição significativa nos animais VACHT KD CLP em relação aos animais WT sham pode ser observada nas categorias: reflexo e função sensorial e no score total do teste comportamental SHIRPA 6 horas após a indução da sepse nos animais VACHT KD.

Figura 22. Teste comportamental SHIRPA 6 horas após o CLP no experimento com donepezila. Após 6h do CLP foi analisado o comportamento através do protocolo SHIRPA. Foi dividido em cinco categorias funcionais distintas: reflexo e função sensorial (A), estado neuropsiquiátrico (B), comportamento motor (C), função autônoma (D) e tônus e força muscular (E). A soma dos escores de todas as categorias está representada como “Total” (F). Os dados estão apresentados com média $\pm$ EPM, 10 animais por grupo. Mann Whitney.

Figura 23. Teste comportamental SHIRPA 6 horas após o CLP no experimento VACHT KD. Após 6h do CLP foi analisado o comportamento através do protocolo SHIRPA. Foi dividido em cinco categorias funcionais distintas: reflexo e função sensorial (A), estado neuropsiquiátrico (B), comportamento motor (C), função autônoma (D) e tônus e força muscular (E). A soma dos escores de todas as categorias está representada como “Total” (F). Os dados estão apresentados com média ± EPM, 8 animais por grupo. Kruskal-Wallis test e post hoc Dunns, * $p < 0,05$ quando comparado com WT Sham.

Em relação às citocinas no hipocampo, os animais que receberam donepezila (Tabela 04) uma diminuição foi observada em IL-10 entre os grupos CLP leve e sham. E nos animais VACHT KD (Tabela 05), mostramos um aumento em IL-10 no grupo VACHT KD CLP em relação ao WT sham e WT CLP.

Tabela 04. Citocinas no hipocampo 15 dias após CLP no experimento com donepezila.

Citocinas	Sham	CLP leve
IL-1 α	1,42 ($\pm$ 1,42)	10 ($\pm$ 10)
IL-1 β	0,82 ($\pm$ 0,24)	0,41 ($\pm$ 0,18)
IL-4	0,13 ($\pm$ 0,01)	0,12 ($\pm$ 0,02)
IL-6	0,26 ($\pm$ 0,07)	0,38 ($\pm$ 0,12)
IL-10	14,25 ($\pm$ 4,70)	0,63 ($\pm$ 0,18)*
IL-12p40	0,27 ($\pm$ 0,13)	0,81 ($\pm$ 0,30)
IL-12p70	0,19 ($\pm$ 0,07)	0,17 ($\pm$ 0,04)
MIP-1 α	4,20 ($\pm$ 4,15)	81,41 ($\pm$ 50,64)
MIP-1 β	0,10 ($\pm$ 0,10)	0,24 ($\pm$ 0,04)
TNF- α	0,11 ($\pm$ 0,02)	0,13 ($\pm$ 0,03)

Nota: Os dados são apresentados com média $\pm$ EPM, cinco animais por grupo. Teste t, *p<0,05.

Tabela 05. Citocinas no hipocampo 15 dias após CLP no experimento VACHT KD.

Citocinas	WT		VACHT KD	
	Sham	CLP	Sham	CLP
IL-1 α	15,42 ($\pm$ 14,9)	1,62 ($\pm$ 1,52)	0,20 ($\pm$ 0,15)	0,003 ($\pm$ 0,003)
IL-1 β	0,43 ($\pm$ 0,26)	0,43 ($\pm$ 0,13)	0,34 ($\pm$ 0,12)	0,33 ($\pm$ 0,16)
IL-4	0,13 ($\pm$ 0,02)	0,14 ($\pm$ 0,008)	0,17 ($\pm$ 0,01)	0,17 ($\pm$ 0,07)
IL-6	0,46 ($\pm$ 0,42)	0,77 ($\pm$ 0,48)	0,22 ($\pm$ 0,10)	1,02 ($\pm$ 0,51)
IL-10	0,16 ($\pm$ 0,05)	2,14 ($\pm$ 0,76)	5,23 ($\pm$ 3,57)	20,84 ($\pm$ 7,05)* δ
IL-12p40	0,31 ($\pm$ 0,31)	0,33 ($\pm$ 0,13)	0,31 ($\pm$ 0,08)	0,46 ($\pm$ 0,24)
IL-12p70	0,107 ($\pm$ 0,05)	0,18 ($\pm$ 0,12)	0,14 ($\pm$ 0,05)	0,26 ($\pm$ 0,10)
MIP-1 α	42,08 ($\pm$ 11,03)	13,27 ($\pm$ 4,94)	12,42 ($\pm$ 4,46)	26,02 ($\pm$ 14,86)
MIP-1 β	0,35 ($\pm$ 0,35)	0,09 ($\pm$ 0,09)	0,07 ($\pm$ 0,07)	1,27 ($\pm$ 0,86)
TNF- α	0,06 ($\pm$ 0,01)	0,05 ($\pm$ 0,01)	0,08 ($\pm$ 0,01)	0,11 ($\pm$ 0,01)

Nota: Os dados são apresentados com média $\pm$ EPM, cinco animais por grupo. ANOVA e post hoc Tukey. *p<0,05 quando comparado com WT Sham e δ p<0,05 quando comparado com WT CLP.

5.3.3 Perfil das células do baço nos animais com donepezila e VACHT KD

O peso do baço dos animais que receberam donepezila está representado na Figura 24 e dos animais VACHT KD na Figura 25. Observamos em ambos os experimentos que o baço dos animais dos grupos CLP estavam significativamente maiores do que os grupos sham, assim como a relação entre o peso do baço/ peso do corpo.

Figura 24. Peso do baço 15 dias após o CLP no experimento com donepezila. Após 15 dias do CLP os animais foram sacrificados, o baço foi coletado e pesado. (A) peso do baço (B) relação do peso do baço/peso do corpo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM, dez animais por grupo. Teste t, * $p < 0,05$.

Figura 25. Peso do baço 15 dias após o CLP no experimento VACHT KD. Após 15 dias do CLP os animais foram sacrificados, o baço foi coletado e pesado. (A) peso do baço (B) relação do peso do baço/peso do corpo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM, oito animais por grupo. ANOVA e post hoc Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com WT sham e # $p < 0,05$ quando comparado com VACHT KD sham.

A caracterização dos linfócitos no baço 15 dias após o CLP nos animais que receberam donepezila está apresentada na Figura 26. Observamos um aumento significativo em linfócito T citotóxico, linfócitos B, células T reguladoras e células Th17 nos grupos CLP leve comparados ao sham. Não houve diferença significativa em linfócitos T auxiliares.

Nos animais VACHT KD, a caracterização dos linfócitos está representada na Figura 27. Observamos um aumento significativo nos linfócito T citotóxico no grupo WT CLP em relação aos grupos WT sham e VACHT KD sham e uma diminuição no grupo VACHT KD CLP em relação aos grupos WT CLP e VACHT KD sham. Observamos também uma diminuição significativa no linfócito T auxiliar no grupo VACHT KD CLP em relação ao grupo VACHT KD sham.

Figura 26. Caracterização de linfócitos no baço 15 dias após o CLP no experimento com donepezila. Após 15 dias do CLP os animais foram sacrificados, o baço foi removido e caracterizado cinco tipos de linfócitos por citometria de fluxo: linfócito T citotóxico (A); linfócitos T auxiliares (B); linfócitos B (C); células T reguladoras (D) e células Th17 (E). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM, dez animais por grupo. Teste t, * $p < 0,05$.

Figura 27. Caracterização de linfócitos no baço 15 dias após o CLP no experimento VACHT KD. Após 15 dias do CLP os animais foram sacrificados, o baço foi removido e caracterizado cinco tipos de linfócitos por citometria de fluxo: linfócito T citotóxico (A); linfócitos T auxiliares (B); linfócitos B (C); células T reguladoras (D) e células Th17 (E). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM, oito animais por grupo. ANOVA e post hoc Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com WT sham, # $p < 0,05$ quando comparado com VACHT KD sham e δ $p < 0,05$ quando comparado com WT CLP.

Células em apoptose inicial (Anexina +), células em necrose (PI +) e apoptose tardia (fragmentação do DNA) estão apresentados nas Figuras 28 (experimento com donepezila) e 29 (animais VACHT KD). Observamos um aumento significativo da morte celular, tanto por apoptose inicial, necrose como por apoptose tardia no grupo CLP em relação ao grupo sham nos animais com donepezila. No entanto, nos animais

VACHT KD observamos um aumento no grupo WT CLP em relação ao grupo WT sham em apoptose inicial. Também observamos, em necrose e apoptose tardia, um aumento no grupo WT CLP em relação aos grupos WT sham e VACHT KD sham e uma diminuição no grupo VACHT KD CLP em relação ao grupo WT CLP.

Figura 28. Morte celular no baço 15 dias após o CLP no experimento com donepezila. Após 15 dias do CLP os animais foram sacrificados, o baço foi removido e os níveis de Anexina + (A), PI + (B) e fragmentação do DNA (C) foram quantificados por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM, 10 animais por grupo. Teste t, * $p < 0,05$.

Figura 29. Morte celular no baço 15 dias após o CLP no experimento VACHT KD. Após 15 dias do CLP os animais foram sacrificados, o baço foi removido e os níveis de Anexina + (A), PI + (B) e fragmentação do DNA (C) foram quantificados por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM, oito animais por grupo. ANOVA e post hoc Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com WT sham, # $p < 0,05$ quando comparado com VACHT KD sham e δ $p < 0,05$ quando comparado com WT CLP.

Mostramos que as citocinas no baço dos animais com donepezila (Tabela 06) foi observado um aumento em IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-12p40 e MIP-1 α , entre os grupos CLP leve e sham. E nos animais VACHT KD (Tabela 07) mostram, em IL-12p40, um aumento nos animais WT CLP em relação ao WT sham e nos animais VACHT KD CLP

em relação ao WT sham e VACHT KD sham. Também é possível observar um aumento nos animais VACHT KD CLP em relação aos grupos WT sham e VACHT KD sham em IL-12p70. Em MIP-1 α observamos um aumento em WT CLP em relação ao WT sham e VACHT KD sham e uma diminuição no VACHT KD CLP em relação ao WT CLP.

Tabela 06. Citocinas no baço 15 dias após CLP no experimento com donepezila.

Citocinas	Sham	CLP leve
IL-1 α	0,62 ($\pm$ 0,45)	3,76 ($\pm$ 0,21)*
IL-1 β	1,02 ($\pm$ 0,18)	1,84 ($\pm$ 0,37)
IL-4	0,48 ($\pm$ 0,12)	1,12 ($\pm$ 0,18)*
IL-6	1,02 ($\pm$ 0,32)	2,09 ($\pm$ 0,19)*
IL-10	0,84 ($\pm$ 0,23)	1,41 ($\pm$ 0,22)
IL-12p40	0,77 ($\pm$ 0,13)	3,03 ($\pm$ 0,44)*
IL-12p70	0,14 ($\pm$ 0,05)	0,50 ($\pm$ 0,16)
MIP-1 α	1,74 ($\pm$ 0,92)	5,52 ($\pm$ 0,58)*
MIP-1 β	9,33 ($\pm$ 2,93)	13,08 ($\pm$ 4,13)
TNF- α	0,35 ($\pm$ 0,07)	0,54 ($\pm$ 0,08)

Nota: Os dados são apresentados com média $\pm$ EPM, cinco animais por grupo. Teste t, *p<0,05.

Tabela 07. Citocinas no baço 15 dias após CLP no experimento VACHT KD.

Citocinas	WT		VACHT KD	
	Sham	CLP	Sham	CLP
IL-1 α	3,54 ($\pm$ 3,54)	6,27 ($\pm$ 2,52)	4,98 ($\pm$ 1,34)	5,31 ($\pm$ 2,78)
IL-1 β	1,18 ($\pm$ 0,25)	1,43 ($\pm$ 0,21)	1,43 ($\pm$ 0,20)	1,44 ($\pm$ 0,28)
IL-4	0,64 ($\pm$ 0,15)	0,78 ($\pm$ 0,18)	0,59 ($\pm$ 0,05)	0,61 ($\pm$ 0,09)
IL-6	2,34 ($\pm$ 0,68)	6,63 ($\pm$ 1,58)	1,61 ($\pm$ 0,33)	5,28 ($\pm$ 1,53)
IL-10	1,53 ($\pm$ 0,47)	6,42 ($\pm$ 1,63)	1,62 ($\pm$ 0,26)	7,85 ($\pm$ 2,48)
IL-12p40	2,08 ($\pm$ 1,99)	10,24 ($\pm$ 1,96)*	1,42 ($\pm$ 0,32)	14,40 ($\pm$ 3,60)*#
IL-12p70	0,21 ($\pm$ 0,07)	1,39 ($\pm$ 0,27)	0,14 ($\pm$ 0,01)	1,78 ($\pm$ 0,58)*#
MIP-1 α	0,47 ($\pm$ 0,38)	7,77 ($\pm$ 0,70)*#	1,77 ($\pm$ 0,71)	0,56 ($\pm$ 0,26) δ
MIP-1 β	3,23 ($\pm$ 1,82)	6,74 ($\pm$ 2,17)	6,84 ($\pm$ 1,82)	4,24 ($\pm$ 1,04)
TNF- α	0,45 ($\pm$ 0,03)	0,80 ($\pm$ 0,12)	0,33 ($\pm$ 0,05)	0,55 ($\pm$ 0,11)

Nota: Os dados são apresentados com média $\pm$ EPM, cinco animais por grupo. ANOVA e post hoc Tukey. *p<0,05 quando comparado com WT sham, #p<0,05 quando comparado com VACHT KD sham e δ p<0,05 quando comparado com WT CLP.

5.3.4 Perfil inflamatório nos animais com donepezila e VACHT KD

As citocinas plasmáticas dos animais que receberam donepezila estão apresentadas na Tabela 08, um aumento somente em IL-6 entre os grupos CLP leve e sham. Referente aos animais VACHT KD (Tabela 09) não foi possível observar nenhuma alteração significativa.

Tabela 08. Citocinas no plasma 15 dias após CLP no experimento com donepezila.

Citocinas	Sham	CLP leve
IL-1 α	4,26 ($\pm$ 4,36)	0,04 ($\pm$ 0,01)
IL-1 β	0,93 ($\pm$ 0,13)	0,62 ($\pm$ 0,09)
IL-4	0,63 ($\pm$ 0,02)	0,55 ($\pm$ 0,03)
IL-6	0,81 ($\pm$ 0,19)	2,84 ($\pm$ 0,55)*
IL-10	1,17 ($\pm$ 0,08)	1,40 ($\pm$ 0,20)
IL-12p40	1,92 ($\pm$ 0,26)	1,17 ($\pm$ 0,19)
IL-12p70	1,45 ($\pm$ 0,11)	1,16 ($\pm$ 0,18)
MIP-1 α	18,0 ($\pm$ 10,50)	0,0 ($\pm$ 0,0)
MIP-1 β	2,17 ($\pm$ 2,15)	0,0 ($\pm$ 0,0)
TNF- α	1,99 ($\pm$ 0,12)	1,70 ($\pm$ 0,26)

Nota: Os dados são apresentados com média $\pm$ EPM, cinco animais por grupo. Teste t, *p<0,05.

Tabela 09. Citocinas no plasma 15 dias após CLP no experimento VACHT KD.

Citocinas	WT		VACHT KD	
	Sham	CLP	Sham	CLP
IL-1 α	13,42 ($\pm$ 5,58)	4,36 ($\pm$ 2,79)	10,63 ($\pm$ 5,90)	0,18 ($\pm$ 0,11)
IL-1 β	0,53 ($\pm$ 0,53)	0,34 ($\pm$ 0,34)	0,97 ($\pm$ 0,0)	1,75 ($\pm$ 1,15)
IL-4	0,67 ($\pm$ 0,28)	0,57 ($\pm$ 0,259)	0,90 ($\pm$ 0,09)	0,79 ($\pm$ 0,12)
IL-6	15,04 ($\pm$ 8,63)	34,14 ($\pm$ 17,56)	0,95 ($\pm$ 0,17)	57,68 ($\pm$ 24,25)
IL-10	19,94 ($\pm$ 18,61)	8,64 ($\pm$ 6,92)	1,42 ($\pm$ 0,12)	4,99 ($\pm$ 2,38)
IL-12p40	0,14 ($\pm$ 0,07)	0,11 ($\pm$ 0,07)	0,81 ($\pm$ 0,09)	0,60 ($\pm$ 0,06)
IL-12p70	1,34 ($\pm$ 0,89)	1,35 ($\pm$ 0,70)	1,87 ($\pm$ 0,28)	3,75 ($\pm$ 2,05)
MIP-1 α	2,95 ($\pm$ 2,95)	1,61 ($\pm$ 1,21)	0,0 ($\pm$ 0,0)	45,72 ($\pm$ 16,92)
MIP-1 β	0,0 ($\pm$ 0,0)	0,0 ($\pm$ 0,0)	0,0 ($\pm$ 0,0)	5,98 ($\pm$ 5,98)
TNF- α	0,39 ($\pm$ 0,38)	1,59 ($\pm$ 0,99)	1,63 ($\pm$ 0,05)	2,57 ($\pm$ 0,78)

Nota: Os dados são apresentados com média $\pm$ EPM, cinco animais por grupo. ANOVA e post hoc Tukey.

6. Discussão

Sepse é uma síndrome clínica decorrente de complicações de infecções graves sendo caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica e lesão tecidual difusa. Está associada a uma desregulação da resposta inflamatória normal, com liberação maciça e descontrolada de mediadores inflamatórios, criando uma cadeia de eventos que levam à lesão tecidual (Abraham et al., 2000; Angus et al., 2001b; Silva et al., 2004). As lesões teciduais ocorrem precocemente na evolução da seps e dependendo da gravidade da seps e. Estas alterações funcionais podem também serem detectadas tardiamente, em modelos experimentais demonstram alterações neurológicas e imunológicas até 30 dias pós seps e (Nascimento et al., 2010; Alves-Filho et al., 2010; Souto et al., 2011; Steckert et al., 2013; Michels et al., 2015; Schwalm et al., 2014; Hernandez et al., 2014; Steckert et al., 2015). Realizamos estudos de alterações neurológicas e imunológicas agudas e crônicas em seps e, e sua interação através da mediação por acetilcolina, a seguir discutimos em separado os dados e literatura.

6.1 Experimento Agudo

Estudos envolvendo modelos animais de seps e, como os modelos murinos de CLP, são clinicamente relevantes, uma vez que induzem uma seps e polimicrobiana que imita a seps e humana (Ritter et al., 2004; Da Silva e Velasco, 2007; Ziaja, 2012). Desta forma, neste experimento agudo, investigamos o perfil neurológico e inflamatório após

6 horas no modelo animal de sepse induzido por CLP, em três diferentes níveis de gravidades da sepse.

Estudos distintos na literatura mostraram diferentes gravidades de CLP (Vanden Berghe et al., 2014; Imamura et al., 2011), e, sabe-se que a gravidade da doença pode ser avaliada de diversas formas, e entre estas a mais prática é a medida de mortalidade (Ziaja, 2012). Neste estudo, a diferença de gravidade pode ser observada por meio da curva de sobrevida dos animais, que mostraram uma taxa de sobrevida de 90% do grupo CLP leve no fim do quinto dia até o 15º dia. No CLP moderado 40% e no CLP grave apenas 20% de sobrevida.

Os camundongos submetidos à CLP imitam a síndrome de insuficiência de múltiplos órgãos (Brooks et al., 2007) e também são aplicados à pesquisa de encefalopatia séptica (Pytel e Alexandre, 2009). Desta forma, neste estudo foi avaliado o estado neuropsiquiátrico, através do teste comportamental SHIRPA, 6 horas após o CLP. Como apresentado, estes animais desenvolvem várias deficiências no funcionamento do cérebro conforme determinado pelo protocolo SHIRPA. Inclusive tivemos achados de alterações no estado neuropsiquiátrico, sugerindo que a encefalopatia está presente nestes animais. Um estudo utilizando o protocolo SHIRPA e CLP mostrou que esses animais sépticos apresentaram, em 6 h, comprometimento do estado neuropsiquiátrico, tônus e força muscular, e função autônoma, e algumas destas disfunções são mantidas até 12 h (Comim et al., 2011b).

Recentemente, alguns estudos têm utilizado o S100 β como biomarcador sérico no diagnóstico de encefalopatia séptica, como mostrado na revisão da Zenaide e Gusmão-Flores, 2013. Desta forma, nós usamos o S100 β e mostramos que há um aumento em todos os grupos CLP, inclusive no CLP moderado e CLP grave em comparação com

sham, confirmando a encefalopatia séptica, mostrando também que quanto mais grave a sepse, maior a quantidade de S100 β .

Sabendo que o hipocampo é particularmente sensível à inflamação sistêmica (Semmler et al., 2005), determinamos os níveis de citocinas nesta área do cérebro e pode-se observar que as citocinas pró-inflamatórias têm uma tendência a aumentar 6 horas após o CLP. Estudos mostraram que estas citocinas, IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α estão aumentadas em hipocampus de ratos 24 horas após o CLP (Comim et al., 2011a; Mina et al., 2014; Michels et al., 2015). Desta forma demonstramos que existe um envolvimento de mediadores inflamatórios na encefalopatia séptica.

As citocinas e mediadores inflamatórios estão elevados sistemicamente conforme dosagens plasmáticas, as células imunológicas são as grandes produtoras destes mediadores. Como o baço concentra grande parte das células imunológicas e uma de suas principais funções é iniciar respostas imunes adaptativas aos antígenos capturados no sangue (Abbas, 2011), nós decidimos investigá-lo. Assim, pesamos os baços dos animais, a fim de verificar se havia esplenomegalia, mas não foi possível observar qualquer alteração em relação ao tamanho e peso dos baços em qualquer dos grupos dos camundongos após 6 horas do CLP.

Os linfócitos desempenham um papel central nas respostas imunitárias específicas contra qualquer antígeno, e nós não observamos alterações tanto nos linfócitos T citotóxicos, linfócitos T auxiliares, linfócitos B, células T reguladoras como nas células Th17, desta forma não estando relacionados com a gravidade da sepse 6 horas após o CLP.

Hiraki e colaboradores (2012) mostraram que após 3 dias da CLP, os percentuais de Tregs em linfócitos do sangue periférico foram significativamente aumentados em pacientes com sepse, e houve uma correlação significativamente positiva entre níveis

plasmáticos de IL-10 e a porcentagem de Tregs em camundongos sépticos. Assim, nós especulamos que 6 horas após a CLP as mudanças não foram capazes de ser detectadas.

A hiperativação do sistema imune, em sepse, manifesta principalmente pelo aumento da produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α e interleucinas: IL-1, IL-6, IL-8 por células endoteliais, neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Hoesel et al., 2006). Assim, decidimos verificar algumas citocinas pró- e anti-inflamatórias na presença de sepse, tais como IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10, no plasma e baço dos camundongos após 6 horas da sepse induzida por CLP.

Os nossos resultados mostraram que todas as citocinas medidas no plasma são aumentadas de acordo com a gravidade da sepse. TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram fortemente implicados como mediadores da sepse, níveis elevados circulantes na sepse estão presentes como apresentado em muitos estudos (Casey et al., 1993; Damas et al., 1997 Blackwell e Christman, 1996; Bown et al., 2001). No baço, citocinas como IL-6, IL-1 β e IL-10 tiveram seus níveis maiores conforme o aumento da gravidade, e o TNF- α não foi alterado 6 horas após a CLP em qualquer gravidade. Alguns estudos mostraram alterações de citocinas tardiamente em sepse, Castoldi e colaboradores (2012) mostraram que a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , TNF- α e IL-6, estão aumentadas no tecido renal mesmo após 24 horas do início da sepse. Em homogeneizados de pulmão 12 e 24 horas após a CLP foi visto um aumento de IL-1 β por Hu e seus colaboradores (2014).

Nossos resultados também concordam com alguns estudos que indicaram que nível de IL-10 elevado sustentado é o principal preditor de gravidade e pior prognóstico em pacientes com sepse grave (Monneret et al., 2004; Wu et al., 2009; Palumbo et al., 2012). Além disso, a IL-6, em nível plasmático, é também um marcador para prever a infecção e a sobrevivência em pacientes com sepse, suportando o conceito de que a IL-6

na fase precoce de sepse pode ser um bom preditor de mortalidade (Selberg et al., 2000; Wu et al., 2009; Wu et al., 2011; Palumbo et al., 2012; Gomez et al., 2014).

Assim demonstramos que a encefalopatia séptica está presente nos animais com CLP e difere de acordo com a gravidade. Mostramos que as citocinas no plasma e no baço encontraram-se alteradas também de acordo com a gravidade da sepse, porém a quantidade de linfócitos no baço não se altera conforme a gravidade da sepse. Neste período inicial da sepse o grau de lesão cerebral não apresenta correlação com as alterações celulares imunológicas encontradas no baço.

6.2 Experimento Crônico

Interações recíprocas entre o sistema imune e o SNC são considerada uma das principais componentes da resposta do hospedeiro no choque séptico. Como mostramos no experimento anterior a encefalopatia séptica está presente 6 horas após CLP, mas não há nenhuma associação com linfócitos do baço, uma vez que o número de linfócitos não é alterado. A nossa hipótese é de que uma alteração cerebral persistente pode influenciar o sistema imunológico, talvez em um ciclo vicioso, com piora da função. Assim, necessitamos de um modelo em que haja sobreviventes de sepse após um período prolongado. No modelo de CLP leve que realizamos previamente verificamos que 90% dos camundongos sobreviveram ao procedimento 15 dias após a CLP. Desta forma, passamos a investigar a interação do SNC com o sistema imune em camundongos sobreviventes a CLP leve.

Nossos resultados mostram que estes animais apresentaram várias deficiências na função cerebral, sugerindo que alterações no estado neuropsiquiátrico estão presentes nestes animais 6 horas após a CLP. No entanto, nós não observamos diferença estatística no teste comportamental SHIRPA 15 dias após CLP. Chavan e colaboradores, em 2012, mostraram que os grupos sham e CLP se comportaram de forma equivalente no teste comportamental SHIRPA 1 mês após CLP, no entanto os camundongos que sobreviveram à sepse grave apresentaram desenvolvimento comprometido da memória significativamente semelhante ao problema clínico observado nos pacientes que sobrevivem a sepse grave. Semmler e colaboradores (2007) mostraram que os animais sobreviventes sépticos apresentaram perda neuronal no hipocampo, sub-regiões das áreas corticais pré-frontais, e reduziu a inervação colinérgica, resultando em efeitos funcionais significativos, tais como perda de memória. Este déficit cognitivo foi também relatado por outro grupo utilizando rivastigmina para inverter os défices cognitivos em sobreviventes a longo prazo em animais sépticos (Comim et al., 2009).

O teste comportamental SHIRPA demonstrou uma mudança precoce do estado neuropsiquiátrico, seis horas após CLP, mas não tardio, 15 dias após. Como vários estudos indicaram uma disfunção cognitiva em sobreviventes de CLP (Barichello et al., 2005; Barichello et al., 2007; Semmler et al., 2007; Comim et al., 2009; Comim et al., 2010; Comim et al., 2012; Petronilho et al., 2012; Leite et al., 2013), levantamos a questão se a encefalopatia séptica está presente 15 dias após CLP, apesar do teste comportamental não estar alterado. Assim, fomos investigar o biomarcador sérico S100 β e mostramos um aumento nos níveis de S100 β no plasma 15 dias após CLP, indicando que os nossos animais apresentaram encefalopatia séptica.

Nós também observamos um aumento significativo em várias citocinas no hipocampo 15 dias após a CLP. Calsavara e colaboradores, 2013, mostraram que animais submetidos a sepse polimicrobiana apresentaram comportamento de ansiedade, que foi acompanhado por um aumento no soro de TNF- α e no cérebro de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , e os níveis de IL-6, 10 dias após o procedimento cirúrgico. Desta forma, sugerimos um envolvimento de mediadores inflamatórios do SNC em encefalopatia séptica 15 dias após o CLP.

A fim de verificar a interação entre a encefalopatia apresentada em nossos animais com a ativação do sistema imune, avaliamos algumas características clássicas das células imunes no baço. Após a infecção, os esplenócitos são ativados e proliferam em alta velocidade, levando a esplenomegalia. Esplenomegalia foi descrito como uma importante complicação da infecção aguda e crônica há mais de 100 anos atrás (Osler, 1908; Pozo et al., 2009). Neste experimente crônico notamos uma mudança significativa no tamanho e peso do baço no grupo CLP comparado com sham. Valdés-Ferrer e colaboradores (2013) mostraram que animais sobreviventes da sepse desenvolveram esplenomegalia significativa, a partir da primeira semana até a quarta semana após o CLP. Realizamos também um corte histológico do baço destes camundongos e mostramos um aumento significativo na polpa branca dos camundongos submetidos ao CLP. A polpa branca é responsável por promover as respostas imunes adaptativas contra antígenos provenientes do sangue, ela é rica em linfócitos (Abbas, 2011). Autores afirmaram que a trombocitopenia associada à sepse é predominante e isto requer a diferenciação de megacariócitos em plaquetas (Andonegui et al., 2005; Wu et al., 2015). Desta forma, aqui, mostramos a presença de megacariócitos no CLP, indicando a disfunção orgânica.

Além da esplenomegalia, fomos verificar se a presença de encefalopatia séptica foi relacionada a uma resposta inflamatória mais intensa no baço. Desta forma, analisamos os tipos de linfócitos no baço, os quais desempenham um papel central nas respostas imunes contra antígenos específicos. O baço reflete o perfil sistêmico, e aqui nós observamos alterações nos linfócitos do baço, 15 dias após CLP, como linfócitos T citotóxicos, linfócitos T auxiliares, linfócitos B e células T reguladoras foram significativamente aumentados no grupo CLP. Estudos mostraram que, após a sepse existe uma disfunção imune generalizada na função das células-T/-B (Mannick, 1993; Ayala et al., 2002). Estas alterações juntamente com alterações na resposta imune fagocítica tem sido associada com o aumento da morbidade e mortalidade em pacientes sépticos (Ayala et al., 2003). No estudo por Gomez e colaboradores (2014) os pacientes sépticos apresentaram maior percentagem de células T CD4 e células T CD8 em apoptose, e níveis mais altos de citocinas pró e anti-inflamatórias, no momento da admissão. Ono e colaboradores, 2013, encontraram um grande aumento na percentagem de Tregs no sangue periférico, células T CD4 circulantes em pacientes com choque séptico.

O grupo de Niedbala mostraram que o óxido nítrico induz a diferenciação em Tregs, e suprimir Th17 através de um mecanismo celular contato-dependente e também parcialmente via IL-10 (Niedbala et al., 2007; Niedbala et al., 2011; Niedbala et al., 2013). Esses dados estão em acordo com os nossos resultados, que mostraram um aumento de Treg e IL-10 no baço de animais sépticos, mas com uma tendência para diminuir Th17. No entanto, julgamos que o aumento de Treg não conduza a um efeito sistêmico, uma vez que este não se correlacionam com encefalopatia séptica, e não aumenta as citocinas, tais como IL-10 no plasma e hipocampo. Por outro lado, é interessante realçar que Th17 mostrou uma correlação negativa com a encefalopatia

séptica. Contudo, a maior produção de óxido nítrico observada na sepse pode ter reduzido o Th17.

O SNC exibe uma dupla função, potenciar respostas imunes e atenuar respostas antivirais e antibacterianas. Estas funções duplas poderiam ser explicadas por um mecanismo em que mediado pelo SNC atenua as respostas Th1 e concomitantemente favorece respostas Th17. A sinalização de dopamina pelo SNC participa da regulação desta resposta Th17 (Pacheco et al., 2014). Assim, contribuindo com os nossos resultados que mostraram uma correlação negativa com Th17 e encefalopatia séptica. A lesão cerebral leva mais S100 β , concomitantemente com a morte de linfócitos e produção reduzida de Th17, conduzindo a um alto perfil imunossupressor e redução de resposta antibacteriana.

O surgimento da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos tem sido correlacionada com o aumento da apoptose, predominantemente em órgãos linfoides (Da Silva e Velasco, 2007). Assim, encontramos um aumento na apoptose inicial, apoptose tardia e necrose nas células do baço de camundongos sobreviventes ao CLP com encefalopatia séptica, confirmando com a imuno-histoquímica. Mostramos também no ciclo celular que as células dos animais CLP encontraram-se mais em fases S e G2, onde estão se multiplicando, porém na fase G1 onde as células estão crescendo, observamos uma diminuição. Assim, mostramos que as células estão se proliferando mais, mas não crescendo, provavelmente por entrarem em apoptose. Apoptose de células imunitárias induzida por sepse foi confirmada em vários estudos post-mortem e ocorre em todos os grupos etários (neonatal, pediátrica e populações adultas), e em resposta a diferentes classes de microorganismos (Hotchkiss et al., 1999; Toti et al., 2004; Felmet et al., 2005). Em modelo animal de CLP, o aumento em apoptose esplénica foi observado 48 horas após a CLP (Schmitz et al., 2010).

Nós também mostramos uma correlação positiva com a morte celular e encefalopatia séptica. Esta correlação entre a apoptose esplênica e encefalopatia pode representar três possibilidades: 1- inflamação sistêmica atingindo todos os órgãos; 2- encefalopatia causando desregulação no baço; e 3- os danos ao baço intensificando os danos cerebrais. Na verdade, nós não encontramos a inflamação sistêmica em 15 dias após a CLP. Por outro lado, verificou-se um perfil predominante anti-inflamatória no baço – apoptose de células T e aumento no número de Treg. Assim, acreditamos que a encefalopatia provoca ação neuronal inadequada, resultando em apoptose de células T e imunodepressão.

Diversos mecanismos de interação de imunossupressão ocorrem na sepse, incluindo o aumento de células T reguladoras, aumento mielóide derivado de células supressoras, esgotamento por apoptose de células efectoras imunes, e como doação de um Th1 a um fenótipo imune anérgico ou Th2 (Munford e Pugin, 2001; Felmet et al., 2005; Venet et al., 2008; Hotchkiss et al., 2013). Outro mecanismo reconhecido de imunossupressão em sepse é a exaustão de células T, Boomer e colaboradores (2011) mostraram no seu estudo post-mortem de baços e pulmões obtidos a partir de doentes que morrem de septicemia resultados altamente consistentes com a imunossupressão.

Assim, conclui-se que os animais sobreviventes do CLP apresentaram encefalopatia séptica, e esta está correlacionada com a diferenciação e morte celular de linfócitos do baço, o que leva a um alto perfil imunossupressor.

6.3 Efeito da acetilcolina na evolução tardia da sepse

A via anti-inflamatória colinérgica controla a resposta inflamatória e consciência nonreflexiva através de uma comunicação bidirecional entre o cérebro e o sistema imunológico (Tracey, 2002). Além disso, sabe-se que a atividade da acetilcolinesterase do cérebro pode ter um papel na regulação do nervo vago nesta via (Pavlov et al., 2009). Aqui nós mostramos que estágios tardios da sepse estão associados com um estado de imunossupressão. No entanto, ainda é desconhecido como as mudanças na função imunológica encontrados em sepse tardia estão relacionados ao dano cerebral.

O SNC controla a função do nervo vago periférico através do braço eferente (via anti-inflamatória colinérgica), e o primeiro neurotransmissor liberado, a ACh, regula a produção de citocinas, especificamente através de sinalização dependente de $\alpha 7$ nAChR (Borovikova et al., 2000; Tracey, 2005; Tracey, 2007). A fim de estudar o papel da ACh no desenvolvimento de alterações neurológicas e imunológicas em fase tardia após a sepse, foram utilizadas duas estratégias: aumentar ou diminuir os níveis de ACh. Donepezila é um inibidor de acetilcolinesterase reversível, inibe a degradação da acetilcolina e compensa para a deficiência de ACh no cérebro (Giacobini, 1993; Francis et al., 1999; Hansen et al., 2008). Assim, neste estudo utilizamos donepezila para facilitar a transmissão colinérgica em animais sépticos. Por outro lado, para reduzir a transmissão colinérgica, utilizamos animais geneticamente modificados para ter expressão reduzida de VACHT (Barbosa et al., 1999; Santos et al., 2001; Barbosa et al., 2002; Prado et al., 2002). Camundongos VACHT KD exibem uma redução de 65% na expressão de VACHT (Prado et al., 2006). Este transportador controla o armazenamento de acetilcolina, o que representa um alvo ideal para bloquear a função colinérgica.

Ao verificar o teste comportamental SHIRPA, observamos uma tendência, mas não significativa, a piora do estado neuropsiquiátrico nos animais CLP com donepezila quanto os animais VACHT KD CLP 6 horas após o CLP. Field e colaboradores (2012) mostraram que donepezila (1mg/kg) protege o cérebro contra danos cognitivos agudos ocasionados pelo LPS, além disso, a diminuição da função colinérgica, utilizando a imunotoxina murine-p75-saporin (mu-p75-sap), confere uma maior susceptibilidade a déficits cognitivos induzidos por esta inflamação aguda. Outros estudos mostraram que a diminuição da transmissão colinérgica utilizando animais VACHT KD compromete a aquisição de memória de reconhecimento de objetos e tarefas cognitivas (Prado et al., 2006; Castro et al., 2009; De Jaeger et al., 2013).

A base anatômica da via anti-inflamatória colinérgica inclui os neurônios pré-ganglionares, que se originam no núcleo motor dorsal do vago e os neurônios pós-ganglionares, localizados nos gânglios do plexo mesentérico celíaco superior, e atinge o baço através do nervo esplênico (Rosas-Ballina et al., 2008), sendo funcionalmente ligada ao baço.

Os baços dos camundongos submetidos ao CLP eram maiores e mais pesados do que dos grupos sham, independentemente do tratamento com donepezila ou VACHT KD. Sendo assim consistente com nosso estudo crônico que também mostramos um aumento significativo no tamanho do baço dos animais 15 dias após o CLP.

Em relação aos linfócitos no baço 15 dias após o CLP, os nossos dados demonstraram que a ACh regula o número de linfócitos do baço. O aumento da transmissão colinérgica por administração de um inibidor de acetilcolinesterase, donepezila, aumentou a quantidade de linfócitos no baço, como linfócitos T citotóxicos, linfócitos B, células T reguladoras e células Th17 e como consequência ajudando na diminuição da inflamação. Estudo com inibidor da acetilcolina, como a galantamina,

mostraram que a inibição da acetilcolinesterase do cérebro suprime a inflamação sistêmica (Pavlov et al., 2009). No experimento utilizando animais VACHT KD observamos uma diminuição dos linfócitos T citotóxicos e auxiliares e um aumento de Th17, mostrando que os animais VACHT KD, aumentaram a inflamação no baço dos animais sépticos. Existem poucos estudos na literatura mostrando os efeitos inflamatórios dos animais VACHT KD, porém estudo recente utilizando estes animais mostraram que a deficiência VACHT induz um ambiente pró-inflamatória no pulmão, associados com um aumento na infiltração de células inflamatórias, sugerindo que a deficiência colinérgica a longo prazo afeta a inflamação pulmonar (Pinheiro et al., 2015).

A morte dos linfócitos, tanto por apoptose inicial, como apoptose tardia e necrose, está presente 15 dias após o CLP nos animais que receberam donepezila. A ocorrência de apoptose linfocitária, como discutido aqui, é um dos principais motivos que levam a fase imunodepressora da sepse (Da Silva e Velasco, 2007). Por outro lado, nos animais VACHT KD não foi possível verificar alterações significativas em relação à morte celular, corroborando com o aumento da inflamação.

As células T do baço têm um papel importante no reflexo inflamatório eferente, e as células T que expressam ChAT+ liberam ACh no baço. ACh depois atua sobre os $\alpha 7$ nAChR em macrófagos e outras células e suprime a liberação de TNF induzida por endotoxina (Rosas-Ballina et al., 2011; Olofsson et al., 2012). No que diz respeito às citocinas, observou-se que a CLP aumentou uma variedade de citocinas pró e anti-inflamatórias em todos os grupos experimentais. Além disso, a ACh desempenhou um papel importante na mediação de produção de citocinas em tecidos e no plasma. Em particular, VACHT KD promove um perfil pró-inflamatório, enquanto a donepezila reduziu os níveis de citocinas ou manteve uma baixa produção, bloqueando assim a

resposta inflamatória. Em termos dos efeitos anti-inflamatórios da ACh, a administração de inibidores de acetilcolinesterase foi mostrado atenuar a gravidade da doença e diminui os níveis de citocinas pro-inflamatórias em diversos modelos experimentais de inflamação (Olofsson et al., 2012). Um estudo de Pavlov e colaboradores (2009) mostraram que o tratamento de animais endotoxêmicos com um inibidor da acetilcolinesterase (galantamina) causou uma diminuição acentuada nos níveis de TNF no soro. Em outra experiência, os animais receberam o inibidor da acetilcolinesterase, neostigmina, e redução dos níveis de TNF- α , IL-1 β , e IL-6 foram observados às 24 h após o CLP (Hofer et al., 2008). No presente estudo, nós também descobrimos que a donepezila, um inibidor da acetilcolinesterase, causou reduções na IL-6 no baço, hipocampo, e no plasma e nos níveis de IL-1 β e TNF- α no plasma em relação ao experimento crônico, que mostraram que o aumento da ACh além de aumentar linfócitos T reguladores, diminui as citocinas inflamatórias, e consequentemente diminui a inflamação.

ACh atenua significativamente a liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-18 mas não da citocina anti-inflamatória IL-10 em culturas de macrófagos humanos estimulados com lipolissacáridos (Borovikova et al., 2000). No nosso estudo, verificou-se que a expressão de IL-10 foi mais elevada no baço, hipocampo, e no plasma após supressão da transmissão colinérgica por animais VACHT KD em relação ao experimento crônico. Os níveis plasmáticos de IL-10 funcionam para neutralizar o processo inflamatório existente, e observou-se um aumento na inflamação em camundongos VACHT KD, concomitante com números reduzidos de células T reguladoras. Estes resultados suportam a análise de sobrevivência, em que os animais VACHT KD exibiram as maiores taxas de mortalidade, potencialmente devido à indução de vias pró-inflamatórias. Por outro lado, os animais tratados com donepezila também exibiram um aumento na

mortalidade com um perfil predominantemente anti-inflamatório; este pode ter resultado na redução da capacidade antibacteriana do sistema imune do hospedeiro. O SNC medeia o equilíbrio das respostas pró e anti-inflamatórias através da função de ACh no baço; portanto, é necessário para evitar mudanças ou prejuízo no funcionamento do cérebro, que podem afetar a interação cérebro-baço.

Os nossos dados mostraram que donepezila, isto é, elevados níveis de ACh, causaram um aumento do número de linfócitos e morte linfocitária e diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, diminuindo assim a inflamação sistêmica e a inflamação no cérebro e baço. Por outro lado, níveis reduzidos de acetilcolina, em animais VACHT KD, resultaram em um decréscimo no número de células T auxiliares e citotóxicas e aumento do número de células Th17. Assim, estes dados fornecem importantes *insights* sobre os mecanismos pelos quais ACh medeia a resposta inflamatória após a indução da sepse.

De uma maneira geral, nesta tese demonstramos que a encefalopatia séptica está presente precocemente nos animais CLP, difere-se de acordo com a gravidade e mantém-se após 15 dias nos sobreviventes. Em relação ao sistema imunológico, observamos que precocemente não conseguimos observar alterações linfocitárias, porém 15 dias após o CLP encontramos um alto perfil imunossupressor, inclusive se correlacionando com o biomarcador sérico de encefalopatia séptica. Confirmando assim nossa hipótese principal onde mostramos que as alterações cerebrais decorrentes da sepse induziram disfunção do sistema imunológico. Além disso, verificamos que a ACh tem um importante papel no perfil imunológico nos sobreviventes da sepse, onde elevados níveis de ACh diminuíram a inflamação sistêmica e a inflamação no cérebro e baço e níveis reduzidos de acetilcolina, aumentaram a inflamação.

7. Conclusão

A alteração do SNC está implicada na indução ou amplificação da alteração do sistema imune e vice-versa, desta forma decidimos demonstrar que a alteração do sistema nervoso central determina comprometimento da resposta imunológica. Assim, concluímos que 6 horas após o CLP a encefalopatia é diferente dependendo da gravidade da sepse. Sepse de qualquer gravidade, no entanto, não leva a alterações nas quantidades de células do baço, apesar da presença da inflamação. Isto indica que em 6 horas após o CLP, o perfil de linfócitos no baço não é alterado por nenhuma gravidade da sepse. Por outro lado, a ativação de células do baço foi indicada no nosso estudo por variações na quantidade de citocinas no baço.

Interações recíprocas entre o sistema imune e o sistema nervoso central são consideradas um dos principais componentes da resposta do hospedeiro no choque séptico. Desta forma, ao verificar a interação entre o sistema imunológico e o sistema neurológico 15 dias após a sepse, concluímos que o modelo animal de sepse por CLP apresenta encefalopatia séptica, e esta está correlacionada com a diferenciação e morte celular de linfócitos do baço, o que leva a um alto perfil imunossupressor.

A via anti-inflamatória colinérgica é por onde o SNC controla a função do nervo vago periférico, através da Ach, confirmamos o importante papel da Ach no perfil inflamatório 15 dias após CLP. Concluímos que a estimulação da transmissão colinérgica, utilização de donepezila, diminui a inflamação, por aumentar linfócitos, morte linfocitária e diminuir citocinas pró-inflamatória. E, ao contrário, a diminuição da transmissão colinérgica, VAcHT KD experimento, observou-se uma diminuição de linfócitos, sem morte celular e aumento da inflamação.

De uma maneira geral, concluímos que a alteração neurológica nos animais com sepse está associada com as alterações imunológicas tardias e que a ACh tem um importante papel no perfil imunológico 15 dias após o CLP.

7. Referências

- Abbas AK. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
- Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent JL, Cohen J, M, Glauser M, Parsons P, Fisher CJ Jr, Repine JE. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Crit Care Med*. 2000; 28: 232-5.
- Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, Guidici D, Granton J, Moreno R, Smithies M, Thomas O, Artigas A, Le Gall JR. Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168:77-84.
- Alves-Filho JC, Spiller F, Cunha FQ. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock*. 2010; 1:15-21.
- Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*. 2005; 106:2417–23.
- Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, De Almeida LM, Nardin P, Cunha AB, Ceresér KM, Santin A, Gottfried C, Salvador M, Kapczinski F, Gonçalves CA. Serum S100 β and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res*. 2007; 41(6):523-9.
- 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*. 2001b; 29(7):1303-10.
- Angus DC, Musthafa AA, Clemont G, Griffin MF, Linde-Zwirble WT, Dremsizou TT, Dinsky M. Quality-adjusted survival in the first year after the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001a; 163: 1389-94.

Antonelli M, Levy M, Andrews PJ, Chastre J, Hudson LD, Manthous C, Meduri Gu, Moreno RP, Putensen C, Stewart T, Torres A. Hemodynamic monitoring in shock and implications for management: International Consensus Conference, Paris, France, 27-28 April 2006. *Intensive Care Med.* 2007; 33: 575-90.

Ayala A, Chung CS, Song GY. Lymphocyte activation, anergy, and apoptosis in polymicrobial sepsis. *Intensive Care Med.* 2002; 31:226-46.

Ayala A, Lomas JL, Grutkoski PS, Chung CS. Pathological aspects of apoptosis in severe sepsis and shock? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003; 35:7–15.

Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today.* 2000; 21(9):418-20.

Barbeiro DF, Barbeiro HV, Faintuch J, Ariga SK, Mariano M, Popi AF, De Souza HP, Velasco IT, Soriano FG. B-1 cells temper endotoxemic inflammatory responses. *Immunobiology.* 2011; 216(3):302-8.

Barbosa JJr, Ferreira LT, Martins-Silva C, Santos MS, Torres GE, Caron MG, Gomez MV, Ferguson SS, Prado MA, Prado VF. Trafficking of the vesicular acetylcholine transporter in SN56 cells: a dynamin-sensitive step and interaction with the AP-2 adaptor complex. *J. Neurochem.* 2002; 82, 1221–8.

Barbosa JJr, Massensini AR, Santos MS, Meireles SI, Gomez RS, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado VF, Prado MA. Expression of the vesicular acetylcholine transporter, proteins involved in exocytosis, and functional calcium signaling in varicosities and soma of a murine septal cell line. *J. Neurochem.* 1999; 73, 1881–93.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori SS, Moreira JC, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(6):831-7.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, DalPizzol F. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* 2005; 33:221-3.

Bencherif M, Lippiello PM, Lucas R, Marrero MB. Alpha7 nicotinic receptors as novel therapeutic targets for inflammation-based diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(6):931-49.

Benjamini E, Coico R, Sunshine G. *Imunologia*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Besedovsky HO, Del Rey A. Physiology of psychoneuroimmunology: A personal view. *Brain Behav Immun.* 2007; 21(1): 34-44.

Biberthaler P, Linsenmeier U, Pfeifer KJ, Kroetz M, Mussack T, Kanz KG, Hoecherl EF, Jonas F, Marzi I, Leucht P, Jochum M, Mutschler W. Serum S-100B concentration provides additional information for the indication of computed tomography in patients after minor head injury: a prospective multicenter study. *Shock.* 2006; 25: 446–453.

Biberthaler P, Mussack T, Wiedemann E, Kanz KG, Koelsch M, Gippner-Steppert C, Jochum M. Evaluation of S-100b as a specific marker for neuronal damage due to minor head trauma. *World J Surg.* 2001; 25: 93–7.

Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br. J. Anaesth.* 1996; 77: 110–7.

Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J Immunol.* 1984; 132(3): 1067-70.

Blalock JE. The immune system as the sixth sense. *J Inter Med.* 2005; 257(2): 126-38.

Bleck TP, Smith MC, Pierre-Louis SJ, Jares JJ, Murray J, Hansen CA. Neurologic complications of critical medical illnesses. *Crit Care Med.* 1993; 21: 98–103.

Blyth BJ, Farhavar A, Gee C, Hawthorn B, He H, Nayak A, Stöcklein V, Bazarian JJ. Validation of serum markers for blood-brain barrier disruption in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2009; 26: 1497–507.

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. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *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.

Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD, Kreisel D, Krupnick AS, Srivastava A, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011; 306(23):2594-605.

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; 405(6785): 458-62.

Bown MJ, Nicholson ML, Bell PR, Sayers RD. Cytokines and inflammatory pathways in the pathogenesis of multiple organ failure following abdominal aortic aneurysm repair. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg*. 2001; 22, 485–95.

Bowton DL, Bertels NH, Prough DS, Stump DA. Cerebral blood flow is reduced in patients with sepsis syndrome. *Crit Care Med*. 1989; 17: 399–403.

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ,

Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 1999; 285(5428):732-6.

Brooks HF, Osabutey CK, Moss RF, Andrews PL, Davies DC. Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. *Metab Brain Dis*. 2007; 22(3-4):353-73.

Bruel-Jungerman E, Lucassen PJ, Francis F. Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. *Behav Brain Res*. 2011; 221: 379–88.

Burns A, Rossor M, Hecker J, Gauthier S, Petit H, Möller HJ, Rogers SL, Friedhoff LT. The effects of donepezil in Alzheimer's disease – results from a multinational trial. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1999; 10(3):237–44.

Calsavara AC, Rodrigues DH, Miranda AS, Costa PA, Lima CX, Vilela MC, Rachid MA, Teixeira AL. Late anxiety-like behavior and neuroinflammation in mice subjected to sublethal polymicrobial sepsis. *Neurotox Res*. 2013; 24(2):103-8.

Capettini SB, Moraes MF, Prado VF, Prado MA, Pereira GS. Vesicular acetylcholine transporter knock-down mice show sexual dimorphism on memory. *Brain Res Bull*. 2011; 85(1-2):54-7.

Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann. Intern. Med*. 1993; 119: 771–8.

Castoldi A, Braga TT, Correa-Costa M, Aguiar CF, Bassi ÊJ, Correa-Silva R, Elias RM, Salvador F, Moraes-Vieira PM, Cenedeze MA, Reis MA, Hiyane MI, Pacheco-Silva Á, Gonçalves GM, Saraiva Câmara NO. TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis. *PLoS One*. 2012; 7(5):e37584.

Castro BM, Pereira GS, Magalhães V, Rossato JI, De Jaeger X, Martins-Silva C, Leles B, Lima P, Gomez MV, Gainetdinov RR, Caron MG, Izquierdo I, Cammarota M,

Prado VF, Prado MA. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter causes learning deficits in mice. *Genes Brain Behav.* 2009; 8(1):23-35.

Chavan SS, Huerta PT, Robbiati S, Valdes-Ferrer SI, Ochani M, Dancho M, Frankfurt M, Volpe BT, Tracey KJ, Diamond B. HMGB1 mediates cognitive impairment in sepsis survivors. *Mol Med.* 2012; 18:930-7.

Collier B, Ilson D. The effect of preganglionic nerve stimulation on the accumulation of certain analogues of choline by a sympathetic ganglion. *J Physiol.* 1977; 264(2): 489-509.

Comim CM, Cassol OJ Jr, Abreu I, Moraz T, Constantino LS, Vuolo F, Galant LS, De Rochi N, Dos Santos Morais MO, Scaini G, Barichello T, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Erythropoietin reverts cognitive impairment and alters the oxidative parameters and energetic metabolism in sepsis animal model. *J. Neural Trans.* 2012; 119(11):1267-74.

Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LC, Petronilho F, Constantino LS, Stertz L, Kapczinski F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Depressive-like parameters in sepsis survivor rats. *Neurotox Res.* 2010; 17(3):279-86.

Comim CM, Constantino LS, Petronilho F, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Aversive memory in sepsis survivor rats. *J. Neural Transm.* 2011b; 118, 213–7.

Comim CM, Pereira JG, Steckert A, Petronilho F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Rivastigmine reverses habituation memory impairment observed in sepsis survivor rats. *Shock.* 2009; 32:270-1.

Comim CM, Vilela MC, Constantino LS, Petronilho F, Vuolo F, Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Rocha JL, Texeira AL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. *Intensive Care Med.* 2011a; 37:711–8.

Conti A. Oncology in neuroimmunomodulation: what progress has been made? *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 917: 68-83.

Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immun.* 2006; 27: 352-7.

Da Silva FP, Velasco IT. Sepsis. Manole. 2007.

Damas P, Canivet JL, de Groote D, Vrindts Y, Albert A, Franchimont P, Lamy M. Sepsis and serum cytokine concentrations. *Crit. Care Med.* 1997; 25: 405–12.

De Jaeger X, Cammarota M, Prado MA, Izquierdo I, Prado VF, Pereira GS. Decreased acetylcholine release delays the consolidation of object recognition memory. *Behav Brain Res.* 2013; 238:62-8.

Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock.* 2005; 24:19-23.

Descamps L, Coisne C, Dehouck B, Cecchelli R, Torpier G. Protective effect of glial cells against lipopolysaccharide-mediated blood barrier injury. *Glia.* 2003; 42:46–58.

Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; 33(7):637-68.

Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D. Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Med.* 2007; 33: 941–50.

Elenkov IJ, Iezzoni DG, Daly A, Harris AG, Ghrousos GP. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. *Neuroimmunomodulation.* 2005; 12: 255–69.

Erickson JD, Varoqui H, Schafer MK, Modi W, Diebler MF, Weihe E, Rand J, Eiden LE, Bonner TI, Usdin TB. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a ‘‘cholinergic’’ gene locus. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 21929–32.

Faix DJ. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Lab Sci.* 2013; 508(1):23-36.

Fang F, Lue LF, Yan S, Xu H, Luddy JS, Chen D, Walker DG, Stern DM, Schmidt AM, Chen JX, Yan SS. RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2010; 24:1043-55.

Felmet KA, Hall MW, Clark RS, Jaffe R, Carcillo JA. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J Immunol.* 2005; 174:3765–72.

Fernandes VJ. Avaliação dos critérios de definição de sepse baseados no “Center for diseases control” na unidade de terapia intensiva de adultos do hospital de clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. *Horizonte Científico.* 2008; 1:1-14.

Field RH, Gossen A, Cunningham C. Prior pathology in the basal forebrain cholinergic system predisposes to inflammation-induced working memory deficits: reconciling inflammatory and cholinergic hypotheses of delirium. *J Neurosci.* 2012; 32(18):6288-94.

Foell D, Roth J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:3762-71.

Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 81:28-37.

Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1999; 66, 137–147.

Frosch M, Strey A, Vogl T, Wulffraat NM, Kuis W, Sunderkötter C, Harms E, Sorg C, Roth J. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease

activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:628-37.

Giacobini E. Pharmacotherapy of Alzheimer disease: new drugs and novel strategies. *Prog. Brain Res.* 1993; 98:447-54.

Gold PE. Acetylcholine: Cognitive and brain functions. *Neurobiol Learn Mem.* 2003; 80:177.

Gomez HG, Gonzalez SM, Londoño JM, Hoyos NA, Niño CD, Leon AL, Velilla PA, Rugeles MT, Jaimes FA. Immunological characterization of compensatory anti-inflammatory response syndrome in patients with severe sepsis: a longitudinal study*. *Crit. Care Med.* 2014; 42:771-780.

Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, Macleod V, Perrot LJ, White CL, Araoz C. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86: 7611-5.

Guidine PA, Rezende GH, Queiroz CM, Mello LE, Prado VF, Prado MA, Pereira GS, Moraes MF. Vesicular acetylcholine transporter knock-down mice are more susceptible to pilocarpine induced status epilepticus. *Neurosci Lett.* 2008; 436(2):201-4.

Gunther ML, Morandi A, Krauskopf E, Pandharipande P, Girard TD, Jackson JC, Thompson J, Shintani AK, Geevarghese S, Miller RR, Canonico A, Merkle K, Cannistraci CJ, Rogers BP, Gatenby JC, Heckers S, Gore JC, Hopkins RO, Ely EW; VISIONS Investigation, VISualizing Icu SurvivOrs Neuroradiological Sequelae. The association between brain volumes, delirium duration, and cognitive outcomes in intensive care unit survivors: the VISIONS cohort magnetic resonance imaging study*. *Crit Care Med.* 2012; 40(7):2022-32.

Hanna N. Sepsis and septic shock. *Top Emerg Med.* 2003; 25(2):158-65.

Hansen RA, Gartlehner G, Webb AP, Morgan LC, Moore CG, Jonas DE. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Interv. Aging.* 2008; 3, 211–25.

Hatcher JP, Jones DN, Rogers DC, et al. Development of SHIRPA to characterize the phenotype of gene-targeted mice. *Behav Brain Res.* 2001;125(1-2):43-7.

Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front. Biosci.* 2002; 7:d1356-68.

Hernandes MS, D'Avila JC, Trevelin SC, Reis PA, Kinjo ER, Lopes LR, Castro-Faria-Neto HC, Cunha FQ, Britto LR, Bozza FA. The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. *J Neuroinflammation.* 2014; 11:36.

Hiraki S, Ono S, Tsujimoto H, Kinoshita M, Takahata R, Miyazaki H, Saitoh D, Hase K. Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor- β decreases the percentages of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival. *Surgery.* 2012; 151(2):313-22.

Hoesel LM, Gao H, Ward PA. New insights into cellular mechanisms during sepsis. *Immunol. Res.* 2006; 34: 133-41.

Hofer S, Eisenbach C, Lukic IK, Schneider L, Bode K, Brueckmann M, Mautner S, Wente MN, Encke J, Werner J, Dalpke AH, Stremmel W, Nawroth PP, Martin E, Krammer PH, Bierhaus A, Weigand MA. Pharmacologic cholinesterase inhibition improves survival in experimental sepsis. *Crit. Care Med.* 2008; 36, 404–8.

Hollenberg SM, Dumasius A, Easington C, Colilla SA, Neumann A, Parrillo JE. Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164:891-895.

Hotchkiss RS, Karl IK. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003; 348: 138–50.

Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 862–874.

Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1999; 27:1230–51.

Hough CL, Curtis JR. Long-term sequelae of critical illness: memories and health-related quality of life. *Crit Care.* 2005; 9: 145-146.

Hu YM; Yeh CL; Pai MH; Lee WY; Yeh SL. Glutamine administration modulates lung $\gamma\delta$ T lymphocyte expression in mice with polymicrobial sepsis. *Shock.* 2014; 41(2):115-22.

Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, Bland KI, Chaudry IH. Cecal ligation and puncture. *Shock.* 2005; 24: S52-7.

Huston JM, Tracey KJ. The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy. *J Intern Med.* 2011; 269:45-53.

Iacobone E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens RD, Sharshar T. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Crit Care Med.* 2009; 37(10):331-6.

ILAS – Latim American Sepsis Institute. Relatório Trimestral dezembro de 2014. Disponível em: <http://www.sepsisnet.org/PDF/Relatorio%20Nacional%20SSC.pdf>

Imamura Y, Wang H, Matsumoto N, Muroya T, Shimazaki J, Ogura H, Shimazu T. Interleukin-1 β causes long-term potentiation deficiency in a mouse model of septic encephalopathy. *Neuroscience.* 2011; 187:63-9.

Imbimbo BP. Pharmacodynamic-tolerability relationships of cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *CNS Drugs.* 2001; 15(5):375–90.

Inanaga K, Ichiki T, Miyazaki R, Takeda K, Hashimoto T, Matsuura H, Sunagawa K. Acetylcholinesterase inhibitors attenuate atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Atherosclerosis*. 2010; 213(1):52-8.

Ingebrigtsen T, Waterloo K, Jacobsen EA, Langbakk B, Romner B. Traumatic brain damage in minor head injury: relation of serum S-100 protein measurements to magnetic resonance imaging and neurobehavioral outcome. *Neurosurgery*. 1999; 45: 468–75.

Itou Y, Nochi R, Kuribayashi H, Saito Y, Hisatsune T. Cholinergic activation of hippocampal neural stem cells in aged dentate gyrus. *Hippocampus*. 2011; 21: 446–59.

Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 2010; 304(16):1787-94.

Jackson AC, Gilbert JJ, Young GB, Bolton CF. The encephalopathy of sepsis. *Can J Neurol Sci*. 1985; 12: 303–7.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immun*. 2002; 20:197-216.

Jann MW, Shirley KL, Small GW. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors. *Clin Pharmacokinet*. 2002; 41(10):719–39.

Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1589(1):1-13.

Kaneko N, Okano H, Sawamoto K. Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. *Genes Cells*. 2006; 11: 1145–59.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006; 13(5): 816-25.

Kotani S, Yamauchi T, Teramoto T, Ogura H. Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, enhances adult hippocampal neurogenesis. *Chem Biol Interact*, 2008. 175: 227–230.

Kourilsky P, Truffa-Bachi P. Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends Immunol*, 2001. 22(9): 502-9.

Kumar A, Krieger A, Symeoneides S, Kumar A, Parrillo J. Myocardial dysfunction in septic shock: Part II. Role of cytokines and nitric oxide. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2001; 15(4): 485-511.

Kung HC, Hoyert DL, Xu J, Murphy SL. Deaths: final data for 2005. *Natl Vital Stat Rep*. 2008; 56:1–120.

Lackner P, Beer R, Heussler V, Goebel G, Rudzki D, Helbok R, Tannich E, Schmutzhard E. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006; 32:177–88.

Leite FB, Prediger RD, Silva MV, De Sousa JB, Carneiro FP, Gasbarri A, Tomaz C, Queiroz AJ, Martins NT, Ferreira VM. Role of nicotine on cognitive and behavioral deficits in sepsis-surviving rats. *Brain Research*. 2013; 1507:74-82.

Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, Schorr C, Artigas A, Ramsay G, Beale R, Parker MM, Gerlach H, Reinhart K, Silva E, Harvey M, Regan S, Angus DC, Surviving Sepsis Campaign. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Crit Care Med*. 2010; 38(2):367-74.

Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, Yang R, Ochani M, Qiang X, Harris HE, Czura CJ, Wang H, Ulloa L, Wang H, Warren HS, Moldawer LL, Fink MP, Andersson U, Tracey KJ, Yang H. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol Med*. 2003; 9(1-2):37-45.

Lima RF, Prado VF, Prado MA, Kushmerick C. Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem.* 2010; 113(4):943-51.

Lorigados CB, Soriano Fg, Szabo C. Pathomechanisms of myocardial dysfunction in sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2011; 10(3):274-84.

Lue LF, Walker DG, Rogers J. Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures. *Neurobiol aging.* 2001; 22:945-56.

Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol.* 2005; 6(12):1182-90.

Mannick JÁ. Trauma, sepsis, and immune defects, in: Faist, E., Meakins, J.L., Schildberg, F.W., Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis. Springer, Berlin, pp. 15–21. 1993.

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: 1546-54.

Masuya H, Inoue M, Wada Y, Shimizu A, Nagano J, Kawai A, Inoue A, Kagami T, Hirayama T, Yamaga A, Kaneda H, Kobayashi K, Minowa O, Miura I, Gondo Y, Noda T, Wakana S, Shiroishi T. Implementation of the modified-SHIRPA protocol for screening of dominant phenotypes in a large-scale ENU mutagenesis program. *Mamm Genome.* 2005; 16(11):829-37.

Matsuda A, Jacob A, Wu R, Aziz M, Yang WL, Matsutani T, Suzuki H, Furukawa K, Uchida E, Wang P. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. *J Nippon Med Sch.* 2012; 79(1):4-18.

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1(2): 135-45.

Melo ES, Barbeiro DF, Gorjao R, Rios EC, Vasconcelos D, Velasco IT, Szabo C, Curi R, De Lima-Salgado TM, Soriano FG. Gene expression reprogramming protects macrophage from septic-induced cell death. *Mol. Immunol.* 2011; 47:2587–93.

Messaris E, Memos N, Chatzigianni E. Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death prolongs survival in sepsis. *Crit Care Med.* 2004; 32: 1764–70.

Michels M, Vieira AS, Vuolo F, Zapelini HG, Mendonça B, Mina F, Domingui D, Steckert A, Schuck PF, Quevedo J, Petronilho F, Dal-Pizzol F. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain Behav Immun.* 2015; 43:54-9.

Mina F, Comim CM, Domingui D, Cassol-Jr OJ, Dall Igna DM, Ferreira GK, Silva MC, Galant LS, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. IL-1 β involvement in cognitive impairment after sepsis. *Mol Neurobiol.* 2014; 49(2):1069-76.

Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke.* 1997; 28:1956–60.

Moine P, Abraham E. Immunomodulation and sepsis: impact of the pathogen. *Shock.* 2004; 22(4):297-308.

Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol. Lett.* 2004; 95: 193–8.

Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163(2):316-21.

Narimatsu N, Harada N, Kurihara H, Nakagata N, Sobue K, Okajima K. Donepezil improves cognitive function in mice by increasing the production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 330: 2–12.

Nascimento DC, Alves-Filho JC, Sônego F, Fukada SY, Pereira MS, Benjamim C, Zamboni DS, Silva JS, Cunha FQ. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2010; 38(8):1718-25.

Nduka OO, Parrillo JE. The pathophysiology of septic shock. *Crit care clin.* 2009; 25(4):677-702.

Netto CB, Portela LV, Félix TM, Souza DO, Gonçalves CA, Giugliani R. Serum S100B levels in patients with neural tube defects. *Clin Chim Acta.* 2006; 364(1-2):275-8.

Nguyen HB, Rivers EP, Abrahamian FM, Moran GJ, Abraham E, Trzeciak S, Huang DT, Osborn T, Stevens D, Talan DA. Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann Emerg Med.* 2006; 48: 28-54.

Niedbala W, Alves-Filho JC, Fukada SY, Vieira SM, Mitani A, Sonogo F, Mirchandani A, Nascimento DC, Cunha FQ, Liew FY. Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(22):9220-5.

Niedbala W, Besnard AG, Jiang HR, Alves-Filho JC, Fukada SY, Nascimento D, Mitani A, Pushparaj P, Alqahtani MH, Liew FY. Nitric oxide-induced regulatory T cells inhibit Th17 but not Th1 cell differentiation and function. *J Immun.* 2013; 191(1):164-70.

Niedbala W, Cai B, Liu H, Pitman N, Chang L, Liew FY. Nitric oxide induces CD4⁺CD25⁺ Foxp3 regulatory T cells from CD4⁺CD25⁺ T cells via p53, IL-2, and OX40. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(39):15478-83.

O'brien JM, Ali NA, Abercgg SK, Abraham E. Sepsis. *Am J Med*. 2007; 120(12): 1012-22.

Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med*. 2002; 30: S58-63.

Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev*. 2012; 248, 188–204.

O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immun*. 2007; 7(5): 353-64.

Ono S, Kimura A, Hiraki S, Takahata R, Tsujimoto H, Kinoshita M, Miyazaki H, Yamamoto J, Hase K, Saitoh D. Removal of increased circulating CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers. *Surgery*. 2013; 153, 262–71.

Opitz B, Eitel J, Meixenberger K, Suttrop N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost*. 2009; 102: 1103-9.

Osler W. Remarks on the functions of an out-patient department: made at the opening of the new out - patient department, Cardiff Infirmary, May 20th, 1908. *Br Med J*. 1908; 1: 1470–1.

Pacheco R, Contreras F, Zouali M. The dopaminergic system in autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2014; 5:117.

Palumbo AA, Forte GI, Pileri D, Vaccarino L, Conte F, D'amelio L, Palmeri M, Triolo A, D'arpa N, Scola L, Misiano G, Milano S, Lio D. Analysis of IL-6, IL-10 and IL-17 genetic polymorphisms as risk factors for sepsis development in burned patients. *Burns*. 2012; 38(2):208-13.

Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, Tighe D, Bennett ED. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med*. 2000; 28: 3019-24.

Parsons SM, Bahr BA, Rogers GA, Clarkson ED, Noremborg K, Hicks BW. Acetylcholine Transporter Vesamicol Receptor Pharmacology and Structure. *Prog Brain Res*. 1993; 98: 175-81.

Pavlov VA, Ochami M, Gallowitsch-Puerta M, Ochami K, Huston JM, Czura CJ, Al-Abed Y, Tracey KJ. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(13):5219-23.

Pavlov VA, Parrish WR, Rosas-Ballina M, Ochani M, Puerta M, Ochani K, Chavan S, Al-Abed Y, Tracey KJ. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun*. 2009; 23(1):41-5.

Pepeu G, Giovannini MG. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learn Mem*. 2004; 11(1): 21-7.

Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2001; 39(5-6):409-13.

Petronilho F, Périco SR, Vuolo F, Mina F, Constantino L, Comim CM, Quevedo J, Souza DO, Dal-Pizzol F. Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. *Brain Beh Immun*. 2012; 26(6):904-10.

Pinheiro NM, Miranda CJ, Perini A, Câmara NO, Costa SK, Alonso-Vale MI, Caperuto LC, Tibério IF, Prado MA, Martins MA, Prado VF, Prado CM. Pulmonary inflammation is regulated by the levels of the vesicular acetylcholine transporter. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0120441.

Pinto WBVR, Souza PVS, Ko GM. Exame neurológico do camundongo. *RESBCAL*. 2013; 2(3): 222-7.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR-4 gene. *Science*. 1998; 282: 2085-8.

Pozo AL, Godfrey EM, Bowles KM. Splenomegaly: investigation, diagnosis and management. *Blood Rev*. 2009; 23, 105–11.

Prado MAM, Reis RAM, Prado VF, De Mello MC, Gomez MV, De Mello FG. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem. Int*. 2002; 41: 291–9.

Prado VF, Martins-Silva C, de Castro BM, Lima RF, Barros DM, Amaral E, Ramsey AJ, Sotnikova TD, Ramirez MR, Kim HG, Rossato JI, Koenen J, Quan H, Cota VR, Moraes MF, Gomez MV, Guatimosim C, Wetsel WC, Kushmerick C, Pereira GS, Gainetdinov RR, Izquierdo I, Caron MG, Prado MA. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron*. 2006; 51(5):601-12.

Pytel P, Alexander JJ. Pathogenesis of septic encephalopathy. *Curr Opin Neurol*. 2009; 22(3):283-7.

Rand JB. Acetylcholine. *WormBook*. 2007; 1-21.

Rangwala F, Dsrisdel RC, Rakhilin S, Ko E, Athuri AB, Fox AP, Salman SS, Green WN. Neuronal alpha-bungarotoxin receptors differ structurally from other nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci.* 1997; 17(21):8201-12.

Reale M, Iarlori C, Gambi F, Lucci I, Salvatore M, Gambi D. Acetylcholinesterase inhibitors effects on oncostatin-M, interleukin-1 beta and interleukin-6 release from lymphocytes of Alzheimer's disease patients. *Exp Gerontol* 2005; 40:165–71.

Reimer RJ, Fon EA, Edwards RH. Vesicular neurotransmitter transport and the presynaptic regulation of quantal size. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1998; 8, 405–12.

Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol.* 2007; 170: 1435-44.

Ribeiro FM, Black SA, Prado VF, Rylett RJ, Ferguson SS, Prado MA. The “ins” and “outs” of the high-affinity choline transporter CHT1. *J. Neurochem.* 2006; 97, 1–12.

Ritter C, Andrades M, Reinke A, Moreira JCF, Dal-Pizzol F. Drug intervention trials in sepsis. *Lancet.* 2004; 364-498.

Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2008; 10: 776-87.

Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol.* 2007; 81:137-43.

Rocha MJA, Oliveira GR, Farias-Corrêa PB. Neurohypophyseal hormone secretion during septic shock. In: Chen FJ (Ed.), 75-94, New Trends in Brain Research. New York: Nova Science Publishers, 2006.

Rodrigues HA, Fonseca Mde C, Camargo WL, Lima PM, Martinelli PM, Naves LA, Prado VF, Prado MA, Guatimosim C. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle

distribution and shape in mouse neuromuscular junction. *PLoS One*. 2013; 8(11):e78342.

Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome*. 1997; 8(10):711-3.

Rogers DC, Peters J, Martin JE, Ball S, Witherden AS, Hefezparast M, Latcham J, Robinson TL, Quilter CA, Fisher EM. SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci Lett*. 2001; 306(1-2):89-92.

Rogers SL, Doody RS, Mohs RC, Friedhoff LT. Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, double-blind, placebo-controlled study. *Arch Intern Med*. 1998b; 158(9):1021–31.

Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*. 1998a; 50(1):136–45.

Rogers SL, Friedhoff LT. The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Dementia*. 1996; 7(6):293–303.

Roghani A, Feldman J, Kohan SA, Shirzadi A, Gundersen CB, Brecha N, Edwards RH. Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91, 10620–4.

Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, Chavan S, Tracey KJ. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 11008–13.

Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, Tusche MW, Pavlov VA, Andersson U, Chavan S, Mak TW, Tracey KJ. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science*. 2011; 334, 98–101.

Rosas-Ballina M, Tracey KJ. The neurology of the immune system: neural reflexes regulate immunity. *Neuron*. 2009; 64:28-32.

Rothermundt M, Ponath G, Arolt V. S100B in schizophrenic psychosis. *Int Rev Neurobiol*. 2004; 59: 445–70.

Roy A, Lara A, Guimarães D, Pires R, Gomes ER, Carter DE, Gomez MV, Guatimosim S, Prado VF, Prado MA, Gros R. An analysis of the myocardial transcriptome in a mouse model of cardiac dysfunction with decreased cholinergic neurotransmission. *PLoS One*. 2012; 7(6):e39997.

Ruan S, Noyes K, Bazarian JJ. The economic impact of S-100B as a pre- head CT screening test on emergency department management of adult patients with mild traumatic brain injury. *J Neurot*. 2009; 26: 1655–64.

Rudinsky B, Hipps R, Bell A, Lozon M, Meadow W. Hemodynamic homeostasis during acute hypoxia in septic and nonseptic piglets: differential role of prostaglandins and nitric oxide. *Pediatric Res*. 2000; 47: 516-23.

Saadeddin SM, Habbab MA, Sobki SH, Ferns GA. Association of systemic inflammatory state with troponin I elevation after elective uncomplicated percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2002; 89(8): 981-3.

Sales J, Andrade JL. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileiras. *Rev Bras Terapia Intensiva*. 2006; 18:9-17.

Santos MS, Barbosa J Jr, Veloso GS, Ribeiro F, Kushmerick C, Gomez MV, Ferguson SS, Prado VF, Prado MA. Trafficking of green fluorescent protein tagged-

vesicular acetylcholine transporter to varicosities in a cholinergic cell line. *J. Neurochem.* 2001; 78: 1104–13.

Sarter M, Hasselmo ME, Bruno JP, Givens B. Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Res Rev.* 2005; 48: 98-111.

Scagnelli GP, Cooper PS, Vandenbroek JM, Berman WF, Schwartz CC. Plasma 1-palmitoyl-2-linoleoyl phosphatidylcholine. Evidence for extensive phospholipase A1 hydrolysis and hepatic metabolism of the products. *J Biol Chem.* 1991; 266(27): 18002-11.

Schmid S, Azzopardi E, De Jaeger X, Prado MA, Prado VF. VACHT knock-down mice show normal prepulse inhibition but disrupted long-term habituation. *Genes Brain Behav.* 2011; 10(4):457-64.

Schmitz D, Kobbe P, Wegner A, Hammes F, Oberbeck R. Dehydroepiandrosterone modulates survival and immune functions during sepsis depending on the way of drug administration. *Med Chem.* 2010; 6(4):229-32.

Schwalm MT, Pasquali M, Miguel SP, Dos Santos JP, Vuolo F, Comim CM, Petronilho F, Quevedo J, Gelain DP, Moreira JC, Ritter C, Dal-Pizzol F Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. *Mol Neurobiol.* 2014; 49(1):380-5.

Selberg O, Hecker H, Martin M, Klos A, Bautsch W, Kohl J. Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit. Care Med.* 2000; 28: 2793–8.

Seltzer B, Zolnouni P, Nunez M, Goldman R, Kumar D, Ieni J, Richardson S. Efficacy of donepezil in early-stage Alzheimer disease: a randomized placebo-controlled trial. *Arch Neurol*. 2004; 61(12):1852–6.

Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, Heneka MT. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol*. 2007; 204: 733-40.

Semmler A, Okulla T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Heneka MT. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J Chem Neuroanat*. 2005; 30: 144-57.

Semmler A, Widmann CN, Okulla T, Urbach H, Kaiser M, Widman G, Mormann F, Weide J, Fliessbach K, Hoeft A, Jessen F, Putensen C, Heneka MT. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013; 84(1):62-9.

Sikora JP, Chlebna-Sokol D, Krzyzanskna-Oberbek A. Proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8); cytokines inhibitors (IL-6sR, sTNFRII) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-13) in the pathogenesis of sepsis in newborn and infants. *Arch Immunol Ther Exp*. 2001; 49:399-404.

Silva E, Pedro MDEA, 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*. 2004; 8: R251-60.

Sloan RP, MacCreath H, Tracey KJ, Sidney S, Liu K, Seeman T. RR interval Variability is inversely related to inflammatory markers: The CARDIA Study. *Mol Med*. 2007; 13(3-4)178-84.

Soriano FG, Liaudet L, Szabo E, Virag L, Mabley JG, Pacher P, Szabo C. Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *Shock*. 2002; 17(4):286-92.

Souto FO, Alves-Filho JC, Turato WM, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, Cunha FQ. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 183(2):234-42.

Sprung CL, Peduzzi PN, Shatney CH, Schein RM, Wilson MF, Sheagren JN, Hinshaw LB. Impact of encephalopathy on mortality in the sepsis syndrome. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group. *Crit Care Med*. 1990; 18: 801-6.

Steckert AV, Comim CM, Igna DM, Dominguni D, Mendonça BP, Ornell F, Colpo GD, Gubert C, Kapczinski F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Effects of sodium butyrate on aversive memory in rats submitted to sepsis. *Neurosci Lett*. 2015; 595:134-8.

Steckert AV, Comim CM, Mina F, Mendonça BP, Dominguni D, Ferreira GK, Carvalho-Silva M, Vieira JS, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Late brain alterations in sepsis-survivor rats. *Synapse*. 2013; 67(11):786-93.

Stromme JH, Halvorsen S, Frederichsen P. Diagnoses and increased levels of troponin T among discharged patients. *Tidssk Nor Lægeforen*. 2001; 121(26): 3041-5.

Takada-Takatori Y, Kume T, Ohgi Y, Izumi Y, Niidome T, Fujii T, Sugimoto H, Akaike A. Mechanism of neuroprotection by donepezil pretreatment in rat cortical neurons chronically treated with donepezil. *J Neurosci Res*. 2008; 86(16):3575-83.

Tan JM, Wong ES, Lim KL. Protein misfolding and aggregation in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11(9):2119-34.

Tavernier B, Li JM, El-Omar MM, Lanone S, Yang ZK, Trayer IP, Mebazaa A, Shah AM. Cardiac contractile impairment associated with increased phosphorylation of troponin I in endotoxemic rats. *Faseb J*. 2001; 15(2): 294-6.

Toti P, De Felice C, Occhini R, Schuerfeld K, Stumpo M, Epistolato MC, Vatti R, Buonocore G. Spleen depletion in neonatal sepsis and chorioamnionitis. *Am J Clin Pathol*. 2004; 122:765–71.

Tracey KJ. Fatal sequence: The killer within. *J Clin Invest*. 2005; 115(12): 3304.

Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Clin Invest*. 2007; 117:289-96.

Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(6): 418-28.

Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002; 420(6917): 853-9.

Triantafilou M; Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trend Immunol*. 2002; 23: 301-4.

Tsuno N. Donepezil in the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 2009; 9(5):591–8.

Valdés-Ferrer SI, Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Dancho ME, Ochani M, Li JH, Scheinerman JA, Katz DA, Levine YA, Hudson LK, Yang H, Pavlov VA, Roth J, Blanc L, Antoine DJ, Chavan SS, Andersson U, Diamond B, Tracey KJ. HMGB1 mediates splenomegaly and expansion of splenic CD11b+ Ly-6C (high) inflammatory monocytes in murine sepsis survivors. *J Intern Med*. 2013; 274, 381–90.

van Eldik LJ, Thompson WL, Ralay Ranaivo H, Behanna HA, Martin Watterson D. Review Glia proinflammatory cytokine upregulation as a therapeutic target for neurodegenerative diseases: function-based and targetbased discovery approaches. *Int Rev Neurobiol*. 2007; 82:277-96.

Vanden Berghe T, Demon D, Bogaert P, Vandendriessche B, Goethals A, Depuydt B, Vuylsteke M, Roelandt R, Van Wonterghem E, Vandenbroecke J, Choi SM, Meyer E, Krautwald S, Declercq W, Takahashi N, Cauwels A, Vandenabeele P. Simultaneous targeting of IL-1 and IL-18 is required for protection against inflammatory and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014; 189, 282–91.

Vandijck D, Decruyenaere JM, Blot SI. The value of sepsis definitions in daily ICU-practice. *Acta Clin Bel*. 2006; 5: 220-6.

Venet F, Chung CS, Monneret G, Huang X, Horner B, Garber M, Ayala A. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol*. 2008; 83(3):523-35.

Ver Elst KM, Spapen HD, Nguyen DN, Garbar C, Huyghens LP, Gorus FK. Cardiac troponins I and T are biological markers of left ventricular dysfunction in septic shock. *Clin Chem*. 2000; 46(5): 650-7.

Vincent JL, Abraham E. The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173: 256-63.

Vincent JL, Korkut HA. Defining sepsis. *Clin Chest Med*. 2008; 29: 585-90.

Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999; 285(5425):248-51.

Wang H, Liao H, Ochani M. Cholinergic agonist inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med*. 2004; 10:1216- 21.

Wang TS, Deng JC. Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression. *J Mol Med*. 2008; 86(5): 495-506.

Wang ZH, Liao YH, Dong JH. Experimental study of cardiac myosininduced autoimmune cardiomyopathy. *Chin J Cardiol*. 2003; 31(12): 937-40.

Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiol.* 2007; 212(9-10):715–22.

Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980; 29:189-201.

Wilkinson DG. The pharmacology of donepezil: a new treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother.* 1999; 1(1): 121-35.

Winblad B, Kilander L, Eriksson S, Minthon L, Båtsman S, Wetterholm AL, Jansson-Blixt C, Haglund A. Donepezil in patients with severe Alzheimer's disease: double-blind, parallel-group, placebo-controlled study. *Lancet.* 2006; 367(9516):1057–65.

Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med.* 2010; 38: 1276-83.

Wolfárd A, Kaszaki J, Szabó C, Szalay L, Nagy S, Boros M. Prevention of early myocardial depression in hyperdynamic endotoxemia in dogs. *Shock.* 2010; 13(1): 46-51.

Wu HP, Chen CK, Chung K, Tseng JC, Hua CC, Liu YC, Chuang DY, Yang CH. Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. *Inflamm Res.* 2009; 58: 385–93.

Wu HP, Shih CC, Lin CY, Hua CC, Chuang DY. Serial increase of IL-12 response and human leukocyte antigen-DR expression in severe sepsis survivors. *Crit Care.* 2011; 15(5):R224.

Wu Q, Ren J, Wang G, Gu G, Hu D, Liu S, Li G, Chen J, Li R, Hong Z, Ren H, Wu X, Li Y, Yao M, Zhao Y, Li J. Evaluating the safety and efficacy of recombinant human thrombopoietin among severe sepsis patients with thrombocytopenia: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2015; 16(1):220.

Wu LL, Tang C, Liu MS. Altered phosphorylation and calcium sensitivity of cardiac myofibrillar proteins during sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281(2): R408-16.

Yamamura HI, Snyder SH. High affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain. *J Neurochem*. 1973; 21(6):1355-74.

Young GB, Bolton CF, Austin TW, Archibald YM, Gonder J, Wells GA. The encephalopathy associated with septic illness. *Clin Invest Med*. 1990; 13: 297–304.

Yu TS, Kim A, Kernie SG. Donepezil rescues spatial learning and memory deficits following traumatic brain injury independent of its effects on neurogenesis. *PLoS One*. 2015; 10(2):e0118793.

Zenaide PV, Gusmao-Flores D. Biomarkers in septic encephalopathy: a systematic review of clinical studies. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2013; 25(1):56-62.

Zhang X, Morrison DC. Lipopolysaccharide-induced selective priming effects on tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med*. 1993; 177(2): 511-6.

Ziaja M. Sepsis and septic encephalopathy: characteristics and experimental models. *Folia Neuropathol*, 2012; 50(3):231-9.