



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
AMANDA DELLA GIUSTINA

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO COM UTILIZAÇÃO DE NUTRACÊUTICOS SOBRE A
DISFUNÇÃO CEREBRAL NA SEPSE**

Tubarão
2018

AMANDA DELLA GIUSTINA

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO COM UTILIZAÇÃO DE NUTRACÊUTICOS SOBRE A
DISFUNÇÃO CEREBRAL NA SEPSE**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Fabricia Petronilho, Dra.

Tubarão

2018

Della Giustina, Amanda, 1988-
D39 Estudo pré-clínico com utilização de nutracêuticos sobre a
disfunção cerebral na sepse / Amanda Della Giustina ; – 2018.
155 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora : Profa. Dra. Fabricia Petronilho.
Tese (doutorado)–Universidade do Sul de Santa
Catarina, Tubarão, 2018.
Inclui bibliografias.

1. Óleos de peixe. 2. Ácido lipóico. 3. Cognição. 4. Sistema
nervoso – Inflamação. 5. Antioxidantes. 6. Comportamento. I.
Petronilho, Fabricia. II. Universidade do Sul de Santa Catarina –
Doutorado em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 614.577

Ficha catalográfica elaborada por Francielli Lourenço CRB 14/1435



UNISUL
UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - DOUTORADO

Título da Tese

Estudo pré-clínico com utilização de nutracêuticos sobre a disfunção cerebral na sepse

AMANDA DELLA GIUSTINA

AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 16 de novembro de 2018.

Doutora Fabricia Cardoso Petronilho (orientador)

Doutora Carla Werlang Coelho (avaliador externo – UDESC)

Doutora Jaqueline da Silva Generoso (avaliador externo – UNESC)

Doutor Luiz Alberto Kanis (avaliador interno)

Doutora Jucélia Jeremias Fortunato (avaliador interno)

Professor Doutor Jefferson Traebert

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

- Unisul – Universidade do Sul de Santa Catarina – Sede - Reitoria – Av. José Acácio Moreira, 787 – Bairro Dehon – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621-3000
- Campus Universitário de Tubarão – Av. José Acácio Moreira, 787 – Bairro Dehon – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621-3000
- Campus Universitário da Grande Florianópolis – Av. Pedra Branca, 25 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-272 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279-1000
- Campus Universitário UnisulVirtual – Av. dos Lagos, 41 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-100 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279-1242

Dedico este trabalho à minha família e ao meu amor, pelo apoio incondicional, e à querida Fa, mais que uma orientadora, um exemplo.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus, por sua bondade infinita.

Ao meu amor, Danilo Café, pela compreensão em momentos de dificuldade e ausência, pelo ombro amigo e acolhimento quando houve dúvidas e incertezas, pelo incentivo e por acreditar em mim, sempre. Te amo.

Aos meus pais, Albertinho e Ledovina, ao meu irmão, Lucas, pelo carinho a cada nova conquista, apoio, incentivo e compreensão. Vocês são meus exemplos e meus alicerces.

À minha querida orientadora, Profa. Fabricia Petronilho, quem me acolheu de braços abertos e não hesitou em contribuir para meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço a dedicação nas orientações, a confiança em meu trabalho, o carinho e a amizade. A mão estendida e as palavras de conforto nos momentos de dificuldade mostram a sua humildade, sua empatia e, acima de tudo, o amor que tem para seus alunos e seu trabalho.

Aos colegas de Doutorado, em especial às amigas Lílian, Mari e Luci, por tantos momentos de cumplicidade, conselhos, apoio e auxílio durante esta jornada de superação constante, além de todo o companheirismo e ensinamento nas atividades experimentais dos projetos. Ter a companhia de vocês tornou o processo mais prazeroso e fácil. Contem comigo, sempre.

À amiga Tábata, e seu marido, Paulo, pelo incentivo, apoio, bom humor e acolhimento durante estes anos de estudos, meus sinceros e carinhosos agradecimentos.

Aos amigos e familiares, pelo apoio e incentivo a seguir adiante, pelas ausências e pelo carinho demonstrado frente a novas oportunidades.

Aos que participam atualmente do nosso grupo de pesquisa, e àqueles que já se formaram e seguiram outros caminhos: Duda, Aloir, Leandro, Raquel, Khiany, Diego, Maryanne, Taís, Marcos, Adriele, Thainá, Thaynan, Gabriel, Rodrigo, Graci, Sandra, Michele, Kiuanne e Larissa. Todos sempre muito participativos e solícitos quando a ajuda foi necessária. Este Doutorado não teria acontecido sem o imenso auxílio de cada um de vocês.

À Profa. Tatiana Barichello e ao Prof. João Quevedo, pela supervisão do estágio de Doutorado Sanduíche na University of Texas Health Sciences Center at Houston, pelo gentil e carinhoso acolhimento, pelos conhecimentos repassados e pela oportunidade cedida. À equipe de pós-doutorandos Gabriel, Gabriela, Natália, Laura, Vijayasree e, em especial, à Giselli e à Letícia, pelo apoio durante os momentos de dificuldade, pelos ensinamentos e auxílio nas análises bioquímicas, pela amizade e conselhos. A experiência se tornou mais prazerosa com a companhia de vocês.

Aos alunos e professores de laboratórios e instituições parceiras, em especial à Jaqueline, à Lutiane e Profa. Josi da UNESC, pelo apoio e auxílio na execução de análises laboratoriais.

Aos professores do PPGCS, pela troca de conhecimentos e experiências, em especial aos membros da banca de qualificação, Prof. Luiz Kanis, Profa. Jucélia e Prof. Marcos, pelas valiosas contribuições e pelos direcionamentos, e aos membros da banca de defesa, pela gentileza em avaliar esta tese e compartilhar valiosas sugestões.

Ao PPGCS, pelo apoio institucional. À secretária Silvane e, durante o início do curso, Marcieli, pela gentileza constante, prestatividade e solicitude em seus trabalhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul), pela concessão de bolsas de estudos. À University of Texas Health Sciences Center at Houston pelo aceite na realização do Estágio de Doutorado Sanduíche.

Finalmente, agradeço respeitosamente aos animais experimentais, seres que cederam suas vidas em prol do avanço da Ciência e do conhecimento sobre a sepsis.

“Se posso aprender, também posso ensinar. Aberto ao novo e nunca cristalizar.”

(Viver – Dead Fish)

RESUMO

Introdução: Sepsé é uma disfunção orgânica com fundo infeccioso que interfere na regulação de órgãos e sistemas, dentre eles o Sistema Nervoso Central (SNC). A inflamação e o estresse oxidativo relacionam-se com o desenvolvimento da disfunção cerebral na sepsé.

Objetivo: Determinar o efeito da associação de ácido α -lipoico (ALA) e óleo de peixe (OP) como uma terapia antioxidante e anti-inflamatória sobre a disfunção cerebral na sepsé.

Métodos: A análise *in vitro* foi realizada em microglias estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) isolado ou adicionado de ALA, OP ou a associação ALA+OP, e citocinas foram determinadas 24 horas após. Na análise *in vivo* ratos Wistar foram submetidos à sepsé por ligação e perfuração cecal (CLP) ou controle (sham). Os animais foram tratados via oral com veículo (salina), ALA, OP, ou a associação (Assoc) e divididos nos grupos Sham+sal, Sham+OP, Sham+ALA, CLP+sal, CLP+OP, CLP+ALA e CLP+Assoc. Em 24 h e 10 dias após a cirurgia o hipocampo, pré-frontal e córtex total foram coletados para determinação de TNF- α , IL-1 β e IL-10, permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), nitrito/nitrato, atividade da mieloperoxidase (MPO), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas carboniladas, atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), NGF e BDNF. Avaliações comportamentais foram realizadas em 10 dias após a cirurgia.

Resultados: A associação de ALA+OP reduziu as concentrações de TNF- α e MPO no córtex total, reduziu as concentrações de IL-1 β no pré-frontal e hipocampo e diminuiu a carbonilação protéica nas três estruturas. ALA+OP elevou as concentrações de BDNF e a atividade da CAT nas três estruturas e preveniu o dano à memória e aprendizado.

Conclusão: A associação de ALA+OP reduz o impacto negativo da sepsé polimicrobiana no SNC de ratos ao diminuir marcadores de inflamação e estresse oxidativo e prevenir o dano cognitivo em longo prazo.

Descritores: Óleo de peixe; ácido lipoico; cognição; neuroinflamação; antioxidante; comportamento.

ABSTRACT

Introduction: Sepsis is a severe organic infection-related dysfunction that impacts the normal regulation of several organ systems, including the central nervous system (CNS). The inflammation and oxidative stress play crucial roles in the development of brain dysfunction in sepsis.

Objective: To determine the effect of a α -lipoic acid (ALA) plus fish oil (FO)-association as an important antioxidant and anti-inflammatory approach on brain dysfunction in septic rats.

Methods: For *in vitro* assay, microglia cells were stimulated with LPS alone or added with ALA, FO or the association of ALA+FO (Assoc) and cytokines were measured at 24 h later. For *in vivo* assay, Wistar rats were subjected to sepsis by cecal ligation and perforation (CLP) or sham (control) and treated orally with vehicle (saline; sal), ALA, FO, or the association (Assoc). Animals were divided into Sham+sal, Sham+FO, Sham+ALA, CLP+sal, CLP+FO, CLP+ALA and CLP+Assoc groups. At 24 h and 10 days after surgery, the hippocampus, prefrontal cortex and total cortex were obtained and assayed for levels of TNF- α , IL-1 β and IL-10, blood brain barrier (BBB) permeability, nitrite/nitrate concentration, myeloperoxidase (MPO) activity, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation, protein carbonyls, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity, NGF and BDNF levels. Behavioral tasks were performed 10 days after surgery.

Results: The association of ALA+FO reduced the levels of TNF- α and MPO in the total cortex, decreased IL-1 β levels in the prefrontal cortex and hippocampus and diminished protein carbonylation in all brain structures. ALA+FO enhanced BDNF levels and CAT activity in all brain structures and prevented memory and learning impairment.

Conclusion: Our findings indicate that the association of ALA+FO diminishes the negative impact of polymicrobial sepsis in the rat brain by reducing inflammatory and oxidative stress markers and preventing long-term cognitive damage.

Keywords: Fish oil; lipoic acid; cognition; neuroinflammation; antioxidant; behavior.

LISTAS

Lista de siglas e abreviaturas

ALA – Ácido α -lipóico (*Alpha-lipoic Acid*)

AGPI – Ácido Graxo Polinsaturado

AGPCML – Ácido Graxo Polinsaturado de Cadeia Muito Longa

AJ - *Adherens Junctions*

AL – Ácido Linoleico

ALA – Ácido α -Linolênico

ANOVA – *Análise de Variância*

ARA – Ácido Araquidônico

ATP – Adenosina Trifosfato

BASES – *Brazilian Sepsis Epidemiological Study*

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Fator*)

BHE – Barreira Hematoencefálica

CARS – Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Compensatória (*Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome*)

CASP - *Colon Ascendens Stent Peritonitis*

CAT – Catalase

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CLP – Ligação e Perfuração Cecal (*Cecal Ligation and Puncture*)

CVOs – Órgãos Circunventriculares (*Circumventricular Organs*)

DAMPs – Padrões Moleculares Associados ao Dano (*Damage-Associated Molecular Pattern*)

DAS – *Delirium* Associado a Sepsis

DHA – Ácido Graxo Docosahexaenoico (*Docosahexaenoic Acid*)

DHLA – Ácido Dihidrolipoico (*Dihydrolipoic Acid*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

EAS – Encefalopatia Associada à Sepsis

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPA – Ácido Graxo Eicosapentaenóico (*Eicosapentaenoic Acid*)

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GDNF - Fator Neurotrófico Derivado da Linhagem de Células Gliais (*Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor*).

GJ – Junções Gap (*Gap Junctions*)

GPx – Glutaciona Peroxidase

GPR120 - Receptor 120 Acoplado à Proteína G (*G-protein coupled receptor 120*)

GSH – Glutaciona Reduzida

IL – Interleucina

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível (*Inducible Nitric Oxide Synthase*)

INR – *International Normalised Ratio*

JAM – Moléculas de Adesão Juncional (*Junctional Adhesion Molecules*)

LPS - Lipopolissacarídeo

LTA – Ácido Lipoteicóico

LTB4 – Leucotrieno B5

MAPK - Quinase Proteica Ativada por Mitógeno (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MMP – Metaloproteinase de Matriz (*Matrix Metalloproteinase*)

MPO – Mieloperoxidase

MPR – Mediadores Pró-resolutivos

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NF-κB – Fator Nuclear kappa B (*Nuclear Factor kappa B*)

NO – Óxido nítrico (*Nitric Oxide*)

NOS – Óxido Nítrico Sintase (*Nitric Oxide Synthase*)

OP – Óleo de Peixe

PA – Pressão Arterial

PAMPs – Padrões Moleculares Associados ao Patógeno

PPAR – Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*)

PRR – Receptores de Reconhecimento de Padrões (*Pattern Recognition Receptor*)

quickSOFA – Avaliação Sequencial de Falência de Órgãos (*quick Sequential Organ Failure Assessment*)

S.C. – Subcutâneo

SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*)

SOD – Superóxido Dismutase

SNC – Sistema Nervoso Central

TJ – Junções Apertadas (*Tight Junctions*)
TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)
TLRs – Receptores *Toll-like* (*Toll-like Receptors*)
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α (*Tumor Necrosis Factor α*)
TTPA – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
UTI – Unidade de Terapia Intensiva
ZO - *Zonula Occludens*

Lista de quadros

Quadro 1 – Definições sobre sepse e condições relacionadas, criado em 1991.	21
Quadro 2 – Sinais e sintomas relacionados à sepse, elaborado em 2001.....	22
Quadro 3 – Síntese dos resultados do estudo da associação.....	115

Lista de figuras

Figura 1 – Reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ pela enzima superóxido dismutase.	34
Figura 2 – Reação de decomposição do H_2O_2 pela enzima catalase.....	34
Figura 3 – Reação de decomposição do H_2O_2 pela enzima glutaciona peroxidase. ...	35
Figura 4 – Enantiômeros do ácido α -lipoico.	38
Figura 5 – Via bioquímica de interconversão dos ácidos graxos ω -6 e ω -3.....	42
Figura 6 – Metodologia do estudo <i>in vivo</i>	55

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	18
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	19
1.1.1 Conceito e epidemiologia da sepse	19
1.1.2 Fisiopatologia da sepse	25
1.1.3 Sistema Nervoso Central e sepse	26
1.1.3.1 Barreira Hematoencefálica	27
1.1.3.2 Encefalopatia associada à sepse	30
1.1.4 Estresse oxidativo na sepse	32
1.1.5 Possibilidades terapêuticas na sepse	36
1.1.5.1 Tratamento da sepse: nutracêuticos.....	37
1.1.5.1.1 <i>Ácido α-lipóico</i>	38
1.1.5.1.2 <i>Óleo de peixe: ω-3</i>	40
1.1.6 Modelos animais de sepse	45
1.1.6.1 Ligação e perfuração cecal (CLP)	46
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	48
2.1 OBJETIVO GERAL	48
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
CAPÍTULO 3: MÉTODOS	50
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	50
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	50
3.3 ANIMAIS	51
3.4 CULTURA PRIMÁRIA DE MICROGLIA.....	51
3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO	52
3.5.1. Indução de sepse	52
3.5.2. Tratamento e grupos experimentais	52
3.5.2.1. In vitro	52
3.5.2.2. In vivo	53
3.6 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	56
3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	56
3.7.1 Coleta de amostras	56
3.7.2 Determinação de citocinas	56
3.7.3 Determinação de BDNF e NGF	56

3.7.4	Avaliação da atividade da mieloperoxidase	57
3.7.5	Determinação da permeabilidade da barreira hematoencefálica	58
3.7.6	Determinação de nitrito/nitrato.....	58
3.7.7	Avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	58
3.7.8	Avaliação de carbonilação protéica.....	59
3.7.9	Determinação da atividade da superóxido dismutase	59
3.7.10	Determinação da atividade da catalase	59
3.7.11	Determinação de proteínas totais	60
3.8	TESTES COMPORTAMENTAIS	60
3.9.1	Habituação ao campo aberto.....	60
3.9.2	Reconhecimento de objetos	61
3.9	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	61
3.10	ASPECTOS ÉTICOS	62
	CAPÍTULO 4: ADMINISTRAÇÃO ISOLADA DE ÁCIDO α-LIPOICO	63
4.1.	RESULTADOS.....	63
4.1.1.	Determinações em 12 e 24 horas	63
4.1.1.1.	Permeabilidade da barreira hematoencefálica	63
4.1.1.2.	Concentração de citocinas	64
4.1.1.3.	Atividade da mieloperoxidase.....	67
4.1.1.4.	Concentração de nitrito e nitrato.....	68
4.1.1.5.	Dano oxidativo a lipídeo e proteína	70
4.1.1.6.	Atividade de enzimas antioxidantes.....	72
4.1.2.	Determinações em 10 dias.....	74
4.1.2.1.	Concentração de BDNF.....	74
4.1.2.2.	Concentração de NGF	74
4.1.2.3.	Teste de habituação em campo aberto	75
4.1.2.4.	Teste de reconhecimento de objetos.....	77
4.2.	DISCUSSÃO.....	78
	CAPÍTULO 5: ADMINISTRAÇÃO ISOLADA DE ÓLEO DE PEIXE.....	84
5.1.	RESULTADOS.....	84
5.1.1.	Determinações em 24 horas	84
5.1.1.1.	Permeabilidade da barreira hematoencefálica	84
5.1.1.2.	Concentração de citocinas	85
5.1.1.3.	Atividade da mieloperoxidase.....	86

5.1.1.4. Concentração de nitrito e nitrato.....	87
5.1.1.5. Dano oxidativo a lipídeo e proteína	88
5.1.1.6. Atividade de enzimas antioxidantes.....	90
5.1.2. Determinações em 10 dias.....	91
5.1.2.1. Concentração de BDNF.....	91
5.1.2.2. Teste de habituação em campo aberto	92
5.1.2.3. Teste de reconhecimento de objetos.....	94
5.2. DISCUSSÃO.....	95
CAPÍTULO 6: ADMINISTRAÇÃO ASSOCIADA DE ÁCIDO α-LIPOICO E ÓLEO DE PEIXE.....	102
6.1. RESULTADOS.....	102
6.1.1. Determinações <i>in vitro</i>	102
6.1.1.1. Concentração de citocinas	102
6.1.2. Determinações em 24 horas	105
6.1.2.1. Concentração de citocinas	105
6.1.2.2. Atividade da mieloperoxidase.....	107
6.1.2.3. Dano oxidativo a proteína.....	108
6.1.2.4. Atividade de enzimas antioxidantes.....	109
6.1.3. Determinações em 10 dias.....	110
6.1.3.1. Sobrevida	110
6.1.3.2. Concentração de BDNF.....	111
6.1.3.3. Teste de habituação em campo aberto	112
6.1.3.4. Teste de reconhecimento de objetos.....	114
6.2 DISCUSSÃO.....	116
7. CONCLUSÃO.....	121
7.1. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	121
REFERÊNCIAS.....	122
ANEXO	155
ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética	155

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A sepse é uma condição caracterizada por alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e imunológicas decorrente de um processo infeccioso; se não contida, a evolução culmina na síndrome da disfunção de múltiplos órgãos¹. O sistema nervoso central (SNC) também pode ser afetado pela sepse, e sua disfunção aguda é denominada Encefalopatia Associada à Sepse (EAS). Esta disfunção pode surgir em fases iniciais da síndrome, sendo então o encéfalo um dos primeiros órgãos afetados, dada a sua elevada vulnerabilidade²⁻⁵.

A sepse e suas consequências respondem por cerca de 20% das internações em Unidades de Terapia Intensiva (UTI)⁶. Apesar dos consideráveis avanços, a sepse continua sendo uma importante causa de mortalidade⁷, tendo em vista que corresponde a 51,9% dos casos no Brasil⁸ e 35,3% dos casos no mundo⁹.

A fisiopatologia da EAS possui íntima relação com as alterações geradas periféricamente pela sepse. Atualmente, a literatura elucida o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento de sepse¹⁰⁻¹³; contudo, a relação deste com a EAS e seus mecanismos demandam esclarecimentos¹⁴. Sob influência de mediadores inflamatórios e agentes oxidantes liberados na periferia, é possível observar alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) de animais 24 horas após a indução de sepse. A partir desta disfunção, ocorre a infiltração de células do sistema imune, passagem de compostos tóxicos e ativação de células gliais, como a microglia, que resultará na potencialização da resposta neuroimune e estimulará a ocorrência de estresse oxidativo e uma resposta inflamatória local^{2,13,14}. Como consequência, observa-se em curto prazo a ocorrência de dano neuronal, que levará a alterações nos sistemas neuroendócrino, autonômico e comportamental^{15,16}. Em longo prazo, estas alterações resultam em déficit cognitivo, como alterações na memória, na concentração e/ou perda global da função cognitiva, além de alterações psiquiátricas, como depressão e ansiedade¹⁷⁻¹⁹.

Neste contexto, terapias antioxidantes e anti-inflamatórias têm sido consideradas como promissoras tratamentos farmacológicos. Atualmente, o ácido α -lipoico (ALA) e o óleo de peixe rico em ω -3 são produtos amplamente estudados para outras doenças, mas pouco explorados na sepse. O ALA é reconhecidamente um potente agente antioxidante universal²⁰. Em um estudo recente, Petronilho et al.

(2015) comprovaram que a administração oral de 200 mg/kg de ALA, em dose única, promoveu redução de marcadores do dano oxidativo em órgãos de animais induzidos à sepse²¹. Já o óleo de peixe (OP) é uma rica fonte de ácidos graxos polinsaturados eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), capaz de modular a síntese de citocinas devido à suas propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias^{22,23}. Considerando os diferentes, porém complementares, papéis desempenhados por estes nutracêuticos, bem como a ausência de relatos científicos publicados até o momento, torna-se relevante avaliar o uso isolado e associado de ALA e OP em modelo animal de sepse. Objetiva-se, por conseguinte, analisar o papel do ALA e do OP, isolados e associados, sobre a mortalidade decorrente da sepse, bem como a influência destes compostos em parâmetros neurobioquímicos e comportamentais, ambos indicativos de disfunção neurológica associada à sepse.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Conceito e epidemiologia da sepse

Conceitualizar e estabelecer critérios diagnósticos para doenças e síndromes é de suma importância para o avanço da ciência e a determinação de condutas clínicas, já que a ausência de um consenso permite o uso intercambiável – equivocado, frequentemente – de diferentes termos como sinônimos para uma condição específica, bem como inviabiliza a realização de estimativas epidemiológicas e a reprodutibilidade de estudos científicos. Frente a este cenário, em 1991 elaborou-se uma definição consensual acerca da doença sepse e suas condições relacionadas, como septicemia, síndrome séptica e choque séptico²⁴.

De fato, esta definição permitiu um grande avanço em relação ao tratamento destinado ao paciente com sepse e às pesquisas sobre o tema; entretanto, percebeu-se que os conceitos estabelecidos apresentavam elevada sensibilidade, mas careciam de especificidade²⁵. Considerando o avanço científico e a baixa especificidade diagnóstica da sepse, grupos de especialistas e pesquisadores rediscutiram, em 2001, as definições criadas na década de 1990 e mantiveram-nas, em sua essência, como os critérios e conceitos a serem utilizados na prática e pesquisa clínicas²⁶.

Sendo assim, define-se como sepse a associação de um quadro infeccioso grave e uma resposta inflamatória sistêmica²⁶⁻²⁹. Contudo, esta condição pode se apresentar como distintas situações clínicas dentro de um contexto evolutivo da doença, o que requer a diferenciação entre um quadro infeccioso, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês *systemic inflammatory response syndrome*), sepse e sepse grave, choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos e sistemas^{26,30}.

As definições de sepse e síndrome correlatas, descritas em 1991, bem como a revisão acerca de seus sinais e sintomas, realizada em 2001, estão elencados nos Quadros 1 e 2, respectivamente.

Quadro 1 – Definições sobre sepse e condições relacionadas, criado em 1991.

Infecção: Processo patológico induzido por micro-organismo
Bacteremia: Presença de bactérias no sangue
Septicemia: Termo em desuso na literatura médica
<p>Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS): Manifestação clínica de um estado de inflamação orgânica, decorrente de insultos como politrauma, pós-operatório, pancreatite, queimaduras e infecções. É definida como a presença de dois ou mais dos seguintes critérios:</p> <p>Temperatura corporal > 38 °C ou < 36 °C</p> <p>Frequência cardíaca > 90 bpm</p> <p>Frequência respiratória < 20 ipm ou PaCO₂ < 32 mmHg</p> <p>Leucograma com > 12.000 ou < 4.000 céls/mm³ ou ainda > 10% de neutrófilos imaturos</p>
Sepse: SIRS ocasionada por infecção (suspeita ou documentada)
<p>Sepse grave: Sepse associada com disfunção orgânica, hipotensão ou sinais de hipoperfusão:</p> <p>Hipotensão: PA sistólica < 90 mmHg ou queda > 40 mmHg do basal na ausência de outras causas</p> <p>Disfunção orgânica: hipoxemia, insuficiência renal aguda, coagulopatia, plaquetopenia, íleo paralítico e hiperbilirrubinemia</p>
Choque séptico: Hipotensão mantida ou necessidade de ionotrópicos-vasopressores, a despeito de ressuscitação volêmica adequada, associadas a sinais de hipoperfusão orgânica (ex.: hiperlactatemia, rebaixamento do nível de consciência, oligúria)
Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos: Presença de disfunções orgânicas que impedem a manutenção da homeostase sem intervenção

Fonte: Mendes; Azevedo, Machado, 2014³¹.

Quadro 2 – Sinais e sintomas relacionados à sepse, elaborado em 2001.

Sepse: infecção comprovada ou suspeita e alguns dos seguintes:
Variáveis gerais: Febre (temperatura central > 38,3 °C) Hipotermia (temperatura central < 36 °C) Frequência cardíaca > 90 bpm Estado mental alterado Edema significativo ou balanço hídrico positivo (>20 mL/kg em 24 horas) Hiperglicemia (> 120 mg/dL na ausência de diabetes)
Variáveis inflamatórias: Leucograma com > 12.000 ou < 4.000 céls/mm ³ ou ainda > 10% de neutrófilos imaturos Proteína C-reativa > 2 desvios-padrão do valor normal Procalcitonina > 2 desvios-padrão do valor normal
Variáveis hemodinâmicas: Hipotensão: PA sistólica < 90 mmHg ou PA média < 70 mmHg ou queda > 40 mmHg do basal Saturação venosa central > 70% Índice cardíaco > 3,5 L/min/m ²
Variáveis de disfunções orgânicas: Hipoxemia arterial (PA de O ₂ /fração inspirada de O ₂ < 300) Oligúria aguda (débito urinário < 0,5 mL/kg/hora por ≥ duas horas) Aumento da creatinina > 0,5 mg/dL Alterações de coagulação (INR > 1,5 ou TTPA > 60 s) Íleo (ausência de ruídos hidroaéreos) Plaquetopenia (< 100.000 células/mm ³) Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total > 4 mg/dL)
Variáveis de perfusão tecidual: Hiperlactatemia (> 1 mmol) Tempo de enchimento capilar lentificado ou livedo reticular

Legenda: INR: International Normalised Ratio; PA: pressão arterial; TTPA: tempo de tromboplastina parcial ativada. Fonte: Mendes; Azevedo, Machado, 2014³¹.

Em 2016, novas definições sobre sepse foram publicadas no *The Journal of the American Medical Association (JAMA)*³². De acordo com este consenso, chamado de *Sepsis-3*, a sepse passa a ser considerada como a disfunção de órgãos, com potencial risco de morte, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente à infecção. Juntamente, a denominação de sepse grave, que servia para identificar a sepse associada à disfunção orgânica, é extinta; mantêm-se os termos sepse e choque séptico, quando há hipotensão refratária à reposição volêmica e uso de vasopressores. Os autores recomendam a realização do diagnóstico de disfunção orgânica por meio do *score* de avaliação sequencial de falência de órgãos (*quickSOFA*, do inglês *quick Sequential Organ Failure Assessment*) que analisa frequência respiratória, pressão sanguínea sistólica e alterações do estado mental.

O diagnóstico da sepse, ou de suas condições evolutivas, ocorre com base nos critérios acima descritos, os quais devem se apresentar de forma aguda e não derivados de outras causas conhecidas. Ademais, estes critérios devem ser utilizados como uma ferramenta dinâmica, devido à rápida modificação no *status* de saúde do paciente sob cuidados em ambiente hospitalar^{31,33}.

Tendo em vista que a presença do foco infeccioso é um fator imperativo para o reconhecimento da sepse, considera-se o isolamento do agente microbiológico o padrão-ouro como critério diagnóstico. Todavia, a realização deste isolamento torna-se inviável em algumas circunstâncias, como em uso precedente de antibioticoterapia, dificuldades para apropriada coleta de amostras ou restrições instrumentais. Desta maneira, o diagnóstico de sepse pode e deve ser realizado com base em suspeitas de um processo infeccioso, a fim de que o indivíduo acometido possa receber tratamento precoce e impedir a progressão da doença³¹.

Em se tratando de características epidemiológicas, a incidência da sepse pode variar conforme a metodologia e nomenclatura utilizadas nos estudos³⁴. Um levantamento de dados realizado no ano de 1995 em 847 hospitais norte-americanos apontou 192.980 casos de incidência de sepse grave; após ajuste para idade e gênero esta incidência aumentou para 751.000 casos ao ano, equivalente a 300 casos para cada 100.000 pessoas. Observou-se, além disso, que 51,1% dos indivíduos necessitaram de internação em UTI e que a taxa de mortalidade nacional foi de 28,6% dos casos. Neste estudo, houve maior incidência de sepse em crianças

menores de um ano e em idosos, especialmente naqueles com idade superior a 85 anos, além de acometer de forma semelhante homens e mulheres³⁵.

A análise de ocorrência de sepse em uma amostra representativa de todos os hospitais não-federais norte-americanos, entre os anos de 1979 e 2000, elencou a ocorrência de 660.000 casos de sepse no ano de 2000, o equivalente a 240,4 casos por 100.000 pessoas, sendo que a sepse grave foi diagnosticada em 256.000 destes casos, o que significa uma incidência de 81 casos para 100.000 pessoas. Verificou-se que indivíduos do gênero masculino e de etnias não brancas apresentaram maior incidência da doença e que 17,9% dos casos morreram em decorrência da sepse³⁶.

Outro estudo norte-americano, conduzido a partir de informações disponibilizadas em base de dados entre os anos de 1993 e 2003, demonstrou a ocorrência de 8.403.766 casos de sepse durante o período avaliado. Especificamente no ano de 2003, foi possível determinar a incidência de 391.544 casos de sepse grave (cerca de 134 casos para 100.000 pessoas) e a taxa de mortalidade em torno de 37%⁷.

No Brasil, a pesquisa BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) foi conduzida entre maio de 2001 e janeiro de 2002 com 1.383 indivíduos diagnosticados com sepse, os quais foram admitidos em três UTIs paulistas e em duas unidades catarinenses. Os dados obtidos indicaram elevada incidência da doença – aproximadamente, 57 casos a cada 1000 atendidos diariamente – além de altas taxas de mortalidade, em torno de 34% para sepse e 47% para sepse grave³⁷.

Outro estudo brasileiro, de caráter observacional multicêntrico e realizado com 524 pacientes sépticos admitidos em 21 UTIs de hospitais públicos e privados do Brasil, avaliados no período entre outubro de 2003 e março de 2004, mostrou uma taxa de mortalidade em torno de 43% e estimou que cada internação custou aos cofres públicos, em média, US\$ 9.632,00, o que representou um valor médio diário de US\$ 934,00 por paciente³⁸.

De acordo com o relatório nacional elaborado pelo Instituto Latino Americano de Sepse e publicado em julho de 2015, envolvendo indivíduos sépticos admitidos em 116 centros de atendimentos desde o ano de 2005, exatamente 27.854 pessoas foram diagnosticadas com a doença, com predominância do gênero masculino (51,7%) e indivíduos entre a fase adulta e idosos (61,1±21,6 anos). Dentre o total

avaliado, 61% dos indivíduos apresentaram sepse grave e a taxa de mortalidade encontrada foi de 43,9%⁸.

1.1.2 Fisiopatologia da sepse

A fisiopatologia da sepse envolve a interação entre o micro-organismo infectante e o hospedeiro. Para delimitar esta interação, o organismo conta com defesas imunológicas, as quais orquestram harmonicamente as respostas dos sistemas imunes inato e adquirido. Frente a um microrganismo, as células integrantes do sistema imune inato (por exemplo, neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos e células dendríticas) iniciarão a resposta imune ao reconhecer, por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptor*), estruturas constitutivas da parede celular deste micro-organismo, como ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicanos, de bactérias Gram-positivas (exotoxinas), ou lipopolissacarídeos (LPS), de bactérias Gram-negativas (endotoxinas)^{39,40}.

Estas estruturas constitutivas são denominadas padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*) e podem ser liberadas durante a replicação do micro-organismo e/ou em virtude de sua morte. Ademais, os receptores PRRs também podem reconhecer outros ligantes derivados de tecidos inflamados, que são proteínas intracelulares ou mediadores liberados por células entrando em apoptose. Estes ligantes são denominados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular pattern molecules*)^{41,42}.

Os receptores PRRs constituem um grande grupo, entre os quais os membros mais importantes estão os receptores *Toll-like* (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*). Estes receptores localizam-se em região transmembrana e possuem domínios extracelulares e citoplasmáticos⁴³. Até o momento, a literatura aponta o direto envolvimento de dois receptores TLR com o desenvolvimento da sepse: o TLR-2 e o TLR-4⁴⁴.

Durante a sepse ocorre um aumento expressivo de PAMPs e DAMPs circulantes; assim, há elevada interação entre estes padrões e os PRRs. A interação promove a superestimulação do sistema imunológico e, conseqüentemente, resposta inflamatória sistêmica⁴¹. Didaticamente, descreve-se esta fase inicial como

a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, ou SIRS⁴⁵. A SIRS é caracterizada pela ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF-κB) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), os quais estão envolvidos com a produção de mediadores inflamatórios - *cytokine storm* – por exemplo, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, quimiocinas e espécies reativas⁴⁶⁻⁴⁸.

Assim, nesta fase inicial pode-se observar a ocorrência de severa desregulação de outros sistemas orgânicos como resultado do ambiente pró-inflamatório causado pela *cytokine storm*⁴¹. Para possibilitar o reestabelecimento da homeostase e a recuperação do organismo, inicia-se outra fase para contrarregular a SIRS, referida como a síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS, do inglês *compensatory anti-inflammatory response syndrome*). Durante a CARS ocorrem estímulos para liberação de moléculas inibitórias, como citocinas anti-inflamatórias, eicosanoides imunomodulatórios e hormônios^{40,49}.

Apesar de serem separadamente descritas, as duas fases ocorrem de maneira paralela. Quando há um encontro de ambas as fases, acredita-se que o cenário pró-inflamatório predomine sobre o anti-inflamatório por até quatro dias, quando então a fase anti-inflamatória passa a agir de maneira mais contundente^{40,50,51}.

A exacerbação da resposta inflamatória leva a alterações na circulação sistêmica, causando vasodilatação e hipotensão, alterações na microcirculação e distúrbios na cascata da coagulação. Estes eventos comprometem a homeostase celular e podem resultar em disfunção do SNC, por meio de mecanismos que podem estar interligados e terem seus efeitos potencializados^{52,53}.

1.1.3 Sistema Nervoso Central e sepse

Os mediadores inflamatórios gerados em decorrência da sepse podem prejudicar o funcionamento do SNC por meio de três vias: a) os sinalizadores inflamatórios gerados em nível periférico são reconhecidos por receptores no nervo vago e ativam sinais aferentes, que são retransmitidos ao núcleo do trato solitário no tronco encefálico; b) estes sinalizadores inflamatórios podem infiltrar-se no encéfalo através do plexo coroide e dos órgãos circunventriculares, que são regiões encefálicas privadas de barreira hematoencefálica (BHE), reguladoras do sistema nervoso autônomo e neuroendócrino e que expressam componentes do sistema

imune; e c) a produção de óxido nítrico e citocinas inflamatórias na fase inicial da sepse ativa as células endoteliais periféricas e cerebrais e estimula a liberação de mediadores inflamatórios no SNC, que influenciará a permeabilidade da BHE^{54,55}.

O estímulo de uma destas vias desencadeará a resposta inflamatória encefálica e envolverá a ativação das células microgлияis. As microgлияs são células do sistema imune residentes no SNC e, normalmente, permanecem em um estado de vigilância imune. Entretanto, em situações de lesão cerebral ou estímulo imunológico, estas células mudam para o estado ativado⁵⁶⁻⁵⁸, o que pode ser verificado pelo aumento na expressão de molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1 (Iba1, do inglês *ionized calcium-binding adapter molecule 1*)^{59,60}, além de diferentes subtipos de receptores TLR. Assim como ocorre periféricamente, ligantes como PAMPs e DAMPs conectam-se aos receptores e há a geração de resposta inflamatória^{61,62}.

As microgлияs são capazes de sintetizar diversos compostos pró-inflamatórios e potencialmente neurotóxicos, como óxido nítrico, espécies reativas como superóxido, citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , e eicosanoides^{61,63-65}. Certamente, esta resposta inflamatória é crucial para a recuperação do SNC; todavia, a resposta inflamatória adquire um caráter nocivo ao prolongar-se, tendo em vista que estimulará danos secundários às células nervosas e exacerbará a ocorrência de lesões estruturais, morte celular e disfunção neurológica^{61,66}. Ademais, este processo retroalimenta a alteração na permeabilidade da BHE, o que propicia a recorrente ocorrência de dano ao sistema nervoso e disfunção deste órgão⁵⁴.

1.1.3.1 Barreira Hematoencefálica

A BHE consiste em uma complexa estrutura, passiva e ativa, que circunda os microvasos encefálicos e protege o SNC contra a exposição a compostos potencialmente tóxicos⁶⁷, ou seja, ela facilita a troca de nutrientes e outros compostos entre o encéfalo e o sangue, colaborando para a manutenção de um ambiente extracelular favorável para a função neuronal⁶⁸. A BHE possui reduzida permeabilidade passiva para inúmeros nutrientes hidrossolúveis e metabólitos essenciais para o tecido nervoso; contudo, apresenta sistemas de transporte específicos que garantem o suprimento de tais substâncias, além de canais iônicos e transportadores que propiciam a função de sinalização sináptica⁶⁹.

Esta barreira reveste praticamente todas as regiões do encéfalo, exceto em locais que regulam o sistema nervoso autônomo e glândulas endócrinas, já que nestas estruturas a difusão de moléculas do sangue por meio da parede do vaso é imprescindível⁷⁰. Estas estruturas com ausência de BHE localizam-se estrategicamente no meio do sistema ventricular, por isso recebem o nome de órgãos circunventriculares (CVOs, do inglês *circumventricular organs*)^{71,72}.

A estrutura juncional paracelular compõe a BHE, a qual inclui três importantes componentes adesivos – *adherens junctions* (AJ), *gap junctions* (GJ) e *tight junctions* (TJ) – ao passo que a matriz extracelular conecta a membrana basal com células endoteliais, astrócitos, pericitos, microglias, e o neurônio em si, formando a unidade neurovascular^{73,74}.

As AJ mediam o contato entre as células endoteliais, sendo representadas principalmente pela caderina-VE (vascular endotelial), uma molécula de adesão transmembrana que regula a permeabilidade vascular, induz o selamento do espaço paracelular e protege as células contra a apoptose. As GJ permitem a comunicação intercelular ao formar aglomerados de canais que as ligam, possibilitando a passagem de pequenas moléculas. São representadas por proteínas da família conexina^{75,76}. As TJ compreendem diferentes componentes proteicos, como ocludinas, claudinas, *zonula occludens* (ZO) e moléculas de adesão juncional (JAM)⁷⁷. A ZO consiste em uma proteína de ancoragem que interage com componentes intracelulares. As moléculas JAM atuam como sinalizadoras para proteínas do citoesqueleto celular e organizadoras da TJ⁷⁶. Já as claudinas e ocludinas parecem desempenhar papéis determinantes: aparentemente, as claudinas ocupam espaço primário na manutenção da permeabilidade, já que a ausência do subtipo 5 compromete profundamente a permeabilidade; às ocludinas cabe o papel de suporte estrutural⁷⁸.

Apesar da ampla diversidade de estruturas que a compõe, a integridade da BHE apresenta considerável dependência das TJ. Ou seja, se determinado processo altera a justaposição destas proteínas, moléculas neurotóxicas terão passagem facilitada para ultrapassar os limites antes impostos por esta barreira física^{68,69,77}.

A disfunção da BHE é considerada o evento inicial na patogênese de diversas doenças do SNC⁷⁹. Na sepse, este processo pode iniciar-se em decorrência do estímulo em uma das três vias anteriormente descritas e dos produtos inflamatórios gerados. Assim, a literatura descreve que o estresse oxidativo

e a inflamação sistêmica são dois importantes mediadores da perda de integridade na BHE em indivíduos sépticos^{80,81}.

O estresse oxidativo favorece o estado pró-inflamatório devido à capacidade de causar lesão endotelial, estimular a liberação de citocinas e fatores quimiotáticos para atração de neutrófilos, além de prejudicar a função mitocondrial⁸². Ainda, ocasiona dano oxidativo à moléculas celulares, como lipídeos, proteínas e DNA, ativam metaloproteinases de matriz (MMPs, do inglês *matrix metalloproteinases*) e alteram a conformação de proteínas das TJ, que resultará em dano tecidual e à BHE⁸³.

A produção de mediadores inflamatórios – em decorrência da elevação na concentração de espécies reativas, ou em virtude do processo inflamatório *per se* – induz a atração de células do sistema imune, como neutrófilos, para o encéfalo após o início da lesão à BHE². Ou seja, durante a evolução do quadro séptico, os neutrófilos podem ser ativados, aderirem ao endotélio vascular e migrar para o SNC. Estas células são cruciais para a resposta imune inata devido à elevada eficiência em degradar bactérias por meio de proteases e espécies reativas⁸⁴.

No entanto, evidências demonstram alterações nas funções dos neutrófilos durante a sepse, implicando em redução no processo de migração destas células ao foco infeccioso e insuficiente resposta antimicrobiana⁸⁵. Também são visualizados acúmulos de neutrófilos em órgãos vitais, envolvidos em dano tecidual e falência de múltiplos órgãos^{86,87}. Sabe-se que o óxido nítrico – e as enzimas que o sintetizam, assim como as espécies reativas formadas a partir dele – influenciam a migração e adesão dos neutrófilos no endotélio, já que diminuem a expressão de moléculas de adesão necessárias para este processo^{85,88}.

O quadro inflamatório também exerce influência sobre as MMPs⁸⁹. As MMPs consistem em enzimas proteolíticas envolvidas na degradação e remodelamento da matriz extracelular e de proteínas da membrana basal da BHE⁹⁰. Fatores de crescimento, agentes químicos, estresse físico, produtos da oncogênese e citocinas (TNF- α e IL-1 β , por exemplo) podem induzir a expressão gênica de MMPs⁹¹. Na sepse, as metaloproteinases tipo 2 e 9 apresentam-se superestimuladas e podem desfazer as junções que interligam as células endoteliais da BHE 24 horas após o início do quadro séptico^{73,92}, levando à alteração na permeabilidade desta barreira.

A integridade da BHE e, por conseguinte, do SNC, possui relação com o aprendizado e a memória⁹³. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do

inglês *brain-derived neurotrophic factor*) é o fator neurotrófico com maior distribuição no encéfalo – particularmente, no hipocampo – e regula a sobrevivência neuronal, velocidade de transmissão sináptica e plasticidade sináptica dependente de atividade⁹⁴. Além disso, em razão de sua capacidade em promover a diferenciação de determinados subtipos de neurônios, acredita-se que o BDNF possa transformar alterações funcionais em estruturais, tanto durante as fases de desenvolvimento encefálico, quanto em consequência de mudança na atividade neuronal⁹⁵.

Estudos que avaliaram a influência de inflamação das meninges por pneumococos sobre o SNC demonstraram que os animais sobreviventes apresentaram prejuízos na memória e aprendizado, e estes achados estiveram correlacionados com redução nos níveis de BDNF no hipocampo^{96–98}. Além disso, o aumento nas concentrações sanguíneas de LPS durante o processo infeccioso pode favorecer a ocorrência destes prejuízos, já que este componente derivado da parede de bactérias gram-negativas pode inibir a produção de fatores neurotróficos^{99,100} e prejudicar a cognição¹⁰¹.

1.1.3.2 Encefalopatia associada à sepse

Durante a sepse, o SNC é um dos primeiros sistemas a ser afetado, e isto se manifesta como encefalopatia associada à sepse (EAS) ou *delirium* associado a sepse (DAS)¹⁰². A EAS é um distúrbio neurológico agudo, difuso e reversível, quando não há falência de órgãos, hipóxia ou outra causa identificável^{55,103}. A prevalência da EAS apresenta ampla variação em virtude da metodologia de detecção empregada, mas estima-se que entre 8% e 70% dos indivíduos internados com sepse em unidades de terapia intensiva apresentem esta encefalopatia, inclusive nas fases iniciais da sepse^{103,104}.

A EAS manifesta-se como uma lentificação no processamento cognitivo, *delirium* (alteração cognitiva aguda na capacidade de atenção, memória, orientação, percepção, entre outros) ou coma¹⁰⁵. Apesar destes sintomas serem transitórios, evidências indicam a ocorrência de danos cognitivos persistentes em longo prazo, ou seja, as complicações neurológicas decorrentes da sepse podem acarretar em prejuízos funcionais, redução na qualidade de vida e elevada mortalidade¹⁰⁶.

Em humanos, um estudo avaliou 25 indivíduos sépticos entre seis e 24 meses após a alta hospitalar e demonstrou a ocorrência de déficit cognitivo na

atenção, fluência e memória verbal e funções executivas, bem como redução no volume do hipocampo¹⁰⁵. A avaliação de uma coorte prospectiva com 1194 indivíduos, oito anos após a completa recuperação de sepse, apontou déficit cognitivo global em 16,7% dos entrevistados, os quais também apresentaram significativos prejuízos funcionais associados¹⁰⁷.

O hipocampo possui elevada vulnerabilidade aos efeitos produzidos pela isquemia, anoxia e inflamação¹⁰⁸. Sabe-se que o LPS estimula o aumento no número de macrófagos e células microgliais perivasculares, que estão relacionadas com o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico e, por consequência, dano neuronal, inibição da neurogênese e redução da função hipocampal^{109,110}.

No entanto, o tecido cortical também encontra-se susceptível a efeitos deletérios promovidos por processos inflamatórios, de estresse oxidativo e infecciosos¹¹¹. O cortex pré-frontal apresenta envolvimento crítico com a flexibilidade cognitiva, tendo em vista que esta região interage com outras áreas, como a amígdala e o hipocampo, para regular respostas condicionadas ao medo e comportamentos exploratórios em ambientes que estimulem a ansiedade¹¹². Em estudos com animais é possível observar comprometimento cognitivo por meio de testes comportamentais. Em um modelo de sepse induzida por ligação e perfuração cecal (CLP, do inglês *cecal ligation and puncture*), observou-se que os animais sobreviventes apresentaram prejuízos no aprendizado e nas memórias espacial e aversiva 10 dias após a indução^{3,113}, sendo persistentes por até 30 dias, período em que o animal encontra-se completamente recuperado da síndrome séptica^{4,114}.

Sabe-se que o dano oxidativo e a inflamação ocorrem rapidamente no cérebro após o início da sepse, e que as alterações cognitivas surgem em longo prazo, mesmo após a resolução do quadro oxidativo e inflamatório^{102,115}. Estas alterações podem decorrer, ao menos parcialmente, do estresse oxidativo, tendo em vista que sobreviventes apresentam marcadores de dano oxidativo em algumas regiões do encéfalo¹⁰⁴, redução nas concentrações de neurotrofinas (por exemplo, BDNF) e no peso do hipocampo após a sepse¹³, e que intervenções terapêuticas que visam reduzir estresse oxidativo estão relacionadas com a prevenção de déficits cognitivos. O uso de n-acetilcisteína e deferoxamina em modelo animal de sepse comprova esta relação^{116,117}.

1.1.4 Estresse oxidativo na sepse

O termo radical livre é usado para designar qualquer átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados^{118–121}. Podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou no caso do rompimento de uma ligação covalente, caso cada um dos átomos envolvidos fiquem com um elétron¹²². Em pesquisas biológicas o termo “radicais livres” é comumente substituído pelo termo “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) para facilitar a compreensão, dada a sua natureza mais abrangente¹²³.

Em condições aeróbicas, mais de 90% do oxigênio é convertido em água pela enzima citocromo oxidase na cadeia transportadora de elétrons, por meio de um mecanismo de quatro elétrons, sem que haja liberação de espécies reativas. O produto desta reação é a geração de ATP por meio da fosforilação oxidativa. Já o oxigênio restante, menos que 10%, é reduzido por meio de vias sucessivas de um elétron ao radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), seguido por nova redução e recebimento de dois prótons para formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2)¹²⁴.

O H_2O_2 não é um radical livre, mas é mais ativo quimicamente que o $O_2^{\cdot-}$ e possui elevada facilidade para difusão através das membranas celulares, por isso é considerado uma ERO¹²⁵. Na sequência de reações, o H_2O_2 recebe outro elétron e pode torna-se o radical hidroxil (HO^{\cdot}) e o ânion hidroxil ($OH^{\cdot-}$). Por fim, o radical hidroxila reage com mais um elétron e próton para formar uma molécula de água¹²⁶. Desta maneira, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e HO^{\cdot} são considerados ERO, mas apenas $O_2^{\cdot-}$ e HO^{\cdot} podem ser chamados de radicais livres.

A dismutação de espécies reativas pode ocorrer na mitocôndria, e que na matriz mitocondrial estão co-localizados metais importantes para o apropriado funcionamento de enzimas antioxidantes, o H_2O_2 gerado a partir da dismutação do $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com o ferro (Fe^{2+}), processo este chamado de Reação de Fenton. O produto desta reação será a formação de HO^{\cdot} . Essa não é a única forma de geração de radical HO^{\cdot} , pois também pode ser gerado por meio da reação de *Haber-Weiss*, onde o HO^{\cdot} é formado após a redução do H_2O_2 mediante a transferência de um elétron do íon superóxido na presença de íons de metais catalíticos^{120,127–129}. A geração endógena de espécies reativas, todavia, também pode acontecer nos peroxissomos, em células inflamatórias ativadas e por meio do metabolismo do citocromo P450¹³⁰.

Além das ERO, existem também aquelas originadas a partir da oxidação do nitrogênio, as espécies reativas de nitrogênio (ERN), dentre as quais estão o óxido nítrico (NO), ânion peroxinitrito (ONOO^-), ânion nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-), ácido peroxinitroso (ONOOH), cátion nitrônio (NO_2^+) e trióxido dinitrogênio (N_2O_3)^{131,132}.

O NO é gerado após a conversão de L-arginina a L-citrulina sob a ação das três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS)¹²⁰. Fisiologicamente, exerce funções importantes, como regulação da peristalse, modulação da pressão arterial, controle do sistema imune, memória e aprendizado¹³³. Entretanto, em determinadas circunstâncias, a ativação da enzima NOS induzível (iNOS) nos macrófagos, neutrófilos ativados e astrócitos, por exemplo, estimula a produção constante de NO em quantidades micromolares, o que leva ao dano tecidual¹³².

Em virtude da elevada capacidade de difusão entre tecidos por meio de eritrócitos, o NO pode ser rapidamente removido ao reagir com a hemoglobina e converter-se a nitrato. No entanto, quando o ânion O_2^- e o NO são sintetizados em locais muito próximos, ocorrerá a combinação espontânea de ambos para formar ONOO^- em reação difusão-limitada, sem a dependência enzimática, já que nenhuma enzima consegue catalizar reações em tal velocidade¹³⁴.

A produção de espécies reativas, radicalares ou não, é parte fundamental da homeostase orgânica, tendo em vista que estes compostos desempenham funções biológicas relevantes^{135,136}. Por exemplo, envolvem-se com o processo de fagocitose, regulação do crescimento celular, ativação de genes, sinalização intercelular e modulação do sistema imune^{121,137,138}. Sendo assim, a completa erradicação destas espécies reativas é inviável e incompatível com a manutenção da vida celular, já que a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, o retículo endoplasmático e o complexo NADPH oxidase são os principais componentes intracelulares a produzirem naturalmente consideráveis quantidades de espécies reativas¹³⁹.

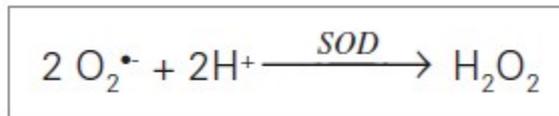
Para manter a homeostase orgânica, ou balanço redox, o organismo dispõe de um complexo sistema de defesa antioxidante, definido como qualquer substância que, mesmo presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, pode retardar ou prevenir a oxidação desse substrato de forma significativa¹³⁶. Desta maneira, o sistema compreende compostos enzimáticos (superóxido dismutase,

catalase e glutathiona peroxidase) e não-enzimáticos (vitaminas, minerais e bioflavonóides, dentre outros)^{140,141}.

De forma didática, as enzimas antioxidantes são consideradas as frentes de atuação primária, capazes de prevenir a formação de espécies reativas ao remover os precursores, ou ao inibi-la catalisticamente. Já os nutrientes com ação antioxidante atuam secundariamente, pois reagem com as espécies reativas já formadas para removê-las ou inibi-las¹⁴².

A enzima superóxido dismutase (SOD) compreende um conjunto de três principais isoformas, diferenciadas basicamente pelo local de expressão e pelo metal que as compõe. Dentre as SOD formadas por cobre e zinco encontram-se a CuZn-SOD (SOD1), presente em compartimentos citoplasmáticos intracelulares, e a EC-SOD (SOD3), visualizada em elementos extracelulares¹⁴³. A terceira isoforma compreende a SOD composta por manganês, Mn-SOD (SOD2), que pode ser encontrada na mitocôndria¹⁴⁴. Independentemente da isoforma, a função da SOD é promover cataliticamente a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Figura 1), permitindo que as demais enzimas do complexo possam fazer posterior transformação a água¹³⁹.

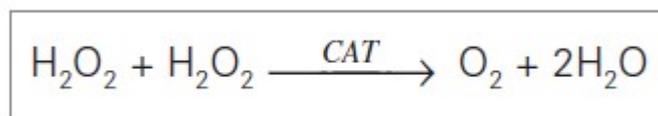
Figura 1 – Reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ pela enzima superóxido dismutase.



Fonte: Adaptado de Schneider & Oliveira, 2004.

A catalase (CAT) é uma heme enzima contendo um grupo prostético com $Fe^{(III/II)}$ em seu centro redox¹⁴⁵. No ciclo de atividade antioxidante, a CAT atua catalizando a decomposição do H_2O_2 a oxigênio e água (Figura 2)¹⁴⁶. Esta enzima pode ser encontrada em maiores concentrações no fígado, rins e eritrócitos¹⁴⁷.

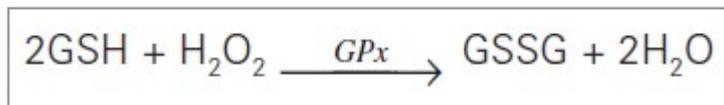
Figura 2 – Reação de decomposição do H_2O_2 pela enzima catalase.



Fonte: Adaptado de Schneider e de Oliveira, 2004¹⁴⁰.

A glutathiona peroxidase (GPx) é uma enzima selênio-dependente que possui atividade de peroxidase, ou seja, catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a oxigênio e água, como a CAT, na presença de glutathiona reduzida (GSH) (Figura 3)^{148,149}. Esta glutathiona no estado oxidado será reduzida pela ação da GSH redutase, na presença de NADPH, para então retornar à sua forma regenerada e proporcionar um novo ciclo de ação para a GPx¹⁵⁰. Além disso, pode reduzir lipoperóxidos a respectivos álcoois, prevenindo o dano oxidativo em membranas¹⁵¹.

Figura 3 – Reação de decomposição do H₂O₂ pela enzima glutathiona peroxidase.



Fonte: Adaptado de Schneider e de Oliveira, 2004¹⁴⁰.

A produção de espécies reativas e a degradação das mesmas pelo sistema de defesa antioxidante ocorre naturalmente, em prol da homeostase e reparos celulares¹²². Contudo, situações específicas podem inviabilizar este estado redox: a) aumento das concentrações de compostos endógenos e exógenos que se autoxidam juntamente com a produção de espécies reativas; b) depleção de reservas de antioxidantes não-enzimáticos; c) inativação de enzimas antioxidantes; d) redução na síntese de enzimas antioxidantes; e) combinação de dois ou mais destes fatores¹⁵². Assim, instala-se um quadro de estresse oxidativo, denominado por uma situação em que a geração de espécies reativas se apresenta transitoriamente ou cronicamente elevada, prejudicando o metabolismo e a regulação celular^{136,153}.

A resolução do quadro de estresse oxidativo é essencial para a restauração do estado redox e, conseqüentemente, adequação das funções orgânicas porque a membrana fosfolipídica é um dos principais componentes estruturais atingidos pelas espécies reativas, ocasionando a peroxidação lipídica e prejudicando a permeabilidade celular. Posteriormente, se estas espécies não forem combatidas, o dano poderá se estender a proteínas, as quais sofrerão modificações conformacionais e funcionais. Por fim, o dano pode propagar-se até o núcleo celular, danificando o DNA e dificultando os mecanismos de reparação^{121,154}. Ainda, os efeitos pró-inflamatórios promovidos pelas espécies reativas incluem lesão

endotelial, geração de fatores quimiotáticos, recrutamento de neutrófilos, liberação de citocinas e dano mitocondrial^{11,155,156}, sendo este cenário favorável para um acúmulo de espécies reativas e o desequilíbrio antioxidante.

O estresse oxidativo e os danos decorrentes estão fisiopatologicamente intrincados com o desenvolvimento de algumas condições, dentre elas a sepse e a decorrente disfunção cerebral¹⁴. Estudos prévios apontaram o desequilíbrio entre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e a ocorrência de dano oxidativo em órgãos como pulmão, diafragma, coração, fígado e rins, após a indução de sepse em ratos Wistar^{157,158}. No SNC, este desequilíbrio também pode ser visualizado já nas seis horas iniciais da sepse, em especial no hipocampo¹⁵⁶. Os danos oxidativos ao SNC, no entanto, podem persistir por até 10 dias após sepse experimental em ratos¹².

O uso de terapias antioxidantes tem se mostrado promissor, tendo em vista que a administração de n-acetilcisteína e deferoxamina preveniu o estresse oxidativo, o infiltrado de neutrófilos e a disfunção mitocondrial, além de elevar a sobrevivência¹¹⁶ e prevenir o dano cognitivo em longo prazo¹¹⁷ em modelo animal de sepse. Já o consumo de ácido lipoico preveniu o estresse oxidativo e a inflamação no fígado e rim de ratos submetidos à indução de sepse por CLP²¹.

1.1.5 Possibilidades terapêuticas na sepse

O estudo sobre sepse nos últimos anos proporcionou o melhor entendimento acerca da fisiopatologia desta síndrome. Apesar do elevado investimento financeiro, a mortalidade decorrente da sepse ainda apresenta-se em altos índices e os resultados terapêuticos continuam insuficientes¹⁵⁹; assim, a abordagem terapêutica da sepse permanece predominantemente de suporte^{160,161}.

Como estratégia fundamental de tratamento da sepse, busca-se ofertar o suporte metabólico e cardiorrespiratório para a manutenção da vida, até a recuperação do indivíduo¹⁶², bem como a administração de antibióticos para o controle do agente infeccioso, reposição de fluidos e agentes vasopressores, ventilação mecânica e remissão da febre¹⁶³. Em relação à novas abordagens, terapias para neutralizar os componentes da parede celular bacteriana, para modular a resposta imediata do hospedeiro ou com a utilização de inibidores da

enzima NOS demonstraram efeitos controversos e necessitam de aprofundamento¹⁶⁴.

Desta maneira, surge a necessidade de desenvolver novas terapias que atuem em diferentes e importantes fatores causais da síndrome séptica, como o estresse oxidativo e a inflamação. Além disso, terapias associadas podem apresentar efeitos complementares, o que intensifica a necessidade de avaliação. Neste contexto, nutracêuticos são opções viáveis para a aplicação na prática clínica em UTI, devido ao baixo custo financeiro e possibilidade de administração por vias comumente utilizadas para a oferta nutricional do indivíduo hospitalizado.

1.1.5.1 Tratamento da sepse: nutracêuticos

Para fins de elucidação didática, torna-se necessário introduzir o conceito de nutracêutico. Criada em 1989 por Stephen DeFelice, o termo é composto pela aglutinação das palavras “nutrição” e “farmacêutico”¹⁶⁵. Segundo este autor:

“Um nutracêutico é qualquer alimento, ou parte dele, que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e ou tratamento de doenças. Estes produtos podem incluir nutrientes isolados, suplementos dietéticos e dietas específicas, bem como alimentos beneficentemente projetados e fabricados, produtos herbais e alimentos processados, como cereais, sopas e bebidas” (DeFelice, 1989, apud Kalra, 2003).

Após esta definição, diversos órgãos regulamentadores internacionais propuseram outras classificações para nutracêuticos, ainda sem sucesso. Em uma revisão de literatura, González-Sarrías et al. (2013)¹⁶⁶ elencam os conceitos elaborados desde a origem do termo e seus pontos críticos. Não obstante, os pesquisadores também sugerem uma nova definição:

“Nutracêutico é um tipo de suplemento dietético e não uma propriedade ou valor. São produtos que entregam uma forma concentrada (extrato, compostos purificados ou combinações) de agente(s) bioativo(s), nutriente ou não-nutriente, mas de origem alimentar (‘nutra-’) em uma dose que deve exceder aquela obtida a partir de alimentos em uma dieta balanceada. Nutracêuticos são utilizados com o propósito de melhorar a saúde (‘-cêutico’) e bem-estar de uma perspectiva fisiológica ou psicológica, com reivindicações específicas além do requerimento nutricional convencional (para prevenir, postergar ou melhorar doenças, ou para complementação

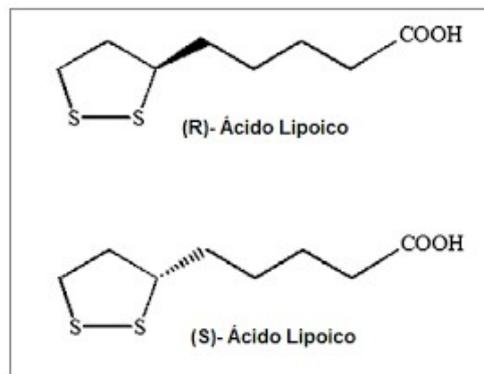
farmacológica de tratamentos sob supervisão médica, mas não para curar patologias)” (González-Sarrías et al. (2013).

Alguns nutracêuticos têm propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, tais como o ácido α -lipoico e o óleo de peixe rico em ácidos graxos ω -3, respectivamente, os quais serão descritos a seguir.

1.1.5.1.1 Ácido α -lipoico

O ácido α -lipoico (ALA), ou ácido tioico, ou *1,2-dithiolane-3-pentanoic acid*, é um composto antioxidante do tipo diltiol de ocorrência celular natural^{167,168}. Sua estrutura é composta por um carbono quiral e uma cadeia de oito carbonos contendo um anel tiolano com ponte dissulfeto entre os carbonos 6 e 8. Ele pode se apresentar sob a forma dos enantiômeros R-(+), a forma de ocorrência natural, ou S-(-), a forma sintética (Figura 4)^{169,170}.

Figura 4 – Enantiômeros do ácido α -lipoico.



Fonte: Adaptado de Shay et al., 2009¹⁷¹.

Após ingerido, o ALA apresenta rápida absorção e meia-vida de 0,56 horas, atingindo pico máximo plasmático entre 10 e 45 minutos¹⁷². Após absorvidos pelos enterócitos, os enantiômeros de ALA são convertidos a ácido dihidrolipoico (DHHLA, do inglês *dihydrolipoic acid*) pelas enzimas citosólicas GSH redutase e tioredoxina redutase e a enzima mitocondrial E3, às custas de NADPH. Tanto o ALA, quanto o DHHLA, podem ser encontrados em diversos tecidos corporais quando ingeridos, sendo o catabolismo do ALA predominantemente decorrente da β -oxidação de sua cadeia lateral¹⁷³, enquanto que a sua metabolização ocorre principalmente no fígado

e a excreção pelo trato urinário^{20,167}. Os principais metabólitos encontrados em amostras de urina de seres humanos foram os ácidos 4,6-dimetiltiohexanoico, 6,8-dimetiltiooctanoico e 2,4-dimetiltiobutanoico¹⁷⁴.

Este composto desempenha duas principais funções no organismo. Inicialmente, o ALA é reconhecidamente um cofator essencial para complexos enzimáticos mitocondriais associados ao ciclo do ácido cítrico e a geração de adenosina trifosfato (ATP)¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Posteriormente, é denominado como antioxidante universal, pois pode atuar em ambientes aquosos ou lipofílicos, meios intracelular ou extracelular, tanto em sua forma oxidada (ALA), quando reduzida (DHHA)¹⁷⁸. É também extremamente eficaz em eliminar espécies reativas e incrementar o *status* antioxidante orgânico, ao estimular a absorção de substâncias antioxidantes de origem dietética, bem como elevar a produção endógena de enzimas antioxidantes¹⁷⁹, o que o faz ser estudado em condições que envolvem a ocorrência de estresse oxidativo^{20,180-182}.

Além disso, este antioxidante é capaz de ultrapassar rapidamente a BHE¹⁸³, otimizar sua função e atenuar o processo inflamatório em nível sistêmico e central¹⁸⁴, já que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias¹⁸⁵. Por este motivo, tem sido avaliado também em situações de lesão cerebral.

Em um modelo de criolesão cerebral, ratos Wistar foram tratados diariamente, durante sete dias, com doses de 100 mg/kg de ALA intraperitonealmente. Foi observado que a administração de ALA estimula o surgimento de células fagocíticas ao local lesionado, o que favorece a resposta imune para restauração tecidual, além de favorecer a integridade da BHE¹⁸⁶. Também normaliza a ativação de astrócitos/micróglia e as concentrações de glutatona¹⁸⁷.

Em um modelo experimental de encefalomielite alérgica induzido em ratos Lewis verificou-se que a administração subcutânea diária de 100 mg/kg de ALA, iniciada seis dias após a indução e mantida por 16 dias, foi capaz de prevenir a infiltração de monócitos no SNC e a alteração na permeabilidade da BHE¹⁸⁸.

Tem-se investigado a aplicação do ALA em casos de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson¹⁸⁹. Pesquisadores apontam que a ingestão de ALA, na concentração de 0,1% na dieta animal, pode reduzir significativamente o déficit de memória hipocampo-dependente, sem afetar as concentrações de β -amiloide, em modelo de Alzheimer utilizando animais Tg2576¹⁹⁰.

A administração subcutânea de 100 mg/kg de ALA reverteu o quadro de estresse oxidativo e melhorou a cognição em animais SAMP8, outro modelo animal da doença¹⁹¹. O uso de ALA, na dose de 25 mg/kg/dia, também parece reverter os danos em memória e aprendizado em modelo animal de neurotoxicidade induzida por alumínio (AlCl₃)¹⁶⁸.

Na sepse, o ALA também apresenta resultados promissores. Em ratos, a administração oral de ácido lipoico, na dose de 200 mg/kg, imediatamente após a indução de sepse por CLP, promoveu redução nas concentrações de citocinas inflamatórias ao suprimir a expressão gênica de NF-κB, melhorou a função renal, além de elevar a taxa de sobrevivência¹⁹². Achados semelhantes foram encontrados por Petronilho et al. (2015)²¹, onde foi verificado que a administração de 200 mg/kg de ALA, imediatamente após a cirurgia de indução por CLP, reduziu marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo no rim e fígado de ratos Wistar. Já em modelo de endotoxemia por LPS, a administração de ALA (100 mg/kg) foi capaz de prevenir a ocorrência de disfunção mitocondrial e de estresse oxidativo nos tecidos hepático, cardíaco e do diafragma¹⁹³.

Entretanto, avaliações dos efeitos do ALA sobre a função cerebral na sepse são escassas. Até o momento, encontra-se disponível apenas um estudo, no qual se investigou o efeito da administração intravenosa de ALA, na dose de 60 mg/kg, em um modelo de endotoxemia por LPS em ratos Wistar. Os autores demonstraram a eficácia do ácido α-lipoico em reduzir marcadores de dano oxidativo no cérebro total¹⁹⁴. Em modelos de sepse polimicrobiana, todavia, não se tem conhecimento do papel desempenhado pelo ALA sobre o desequilíbrio entre o dano oxidativo e enzimas antioxidantes em estruturas cerebrais, como o hipocampo e cortex prefrontal, e a sua relação com a alteração da memória.

1.1.5.1.2 Óleo de peixe: ω-3

O ácido graxo ω-3 pertence à família dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e recebe esta denominação em virtude da posição em que se encontra a dupla ligação mais próxima ao terminal metila da cadeia acila¹⁹⁵. De uma forma simplista, quando citamos “ω-3” referimo-nos ao ácido α-linolênico (ALA; 18:3 ω-3), o qual possui uma cadeia hidrocarbonada com 18 carbonos e a última dupla ligação entre os carbonos 3 e 4 a partir do grupamento metil¹⁹⁶. É importante ressaltar que

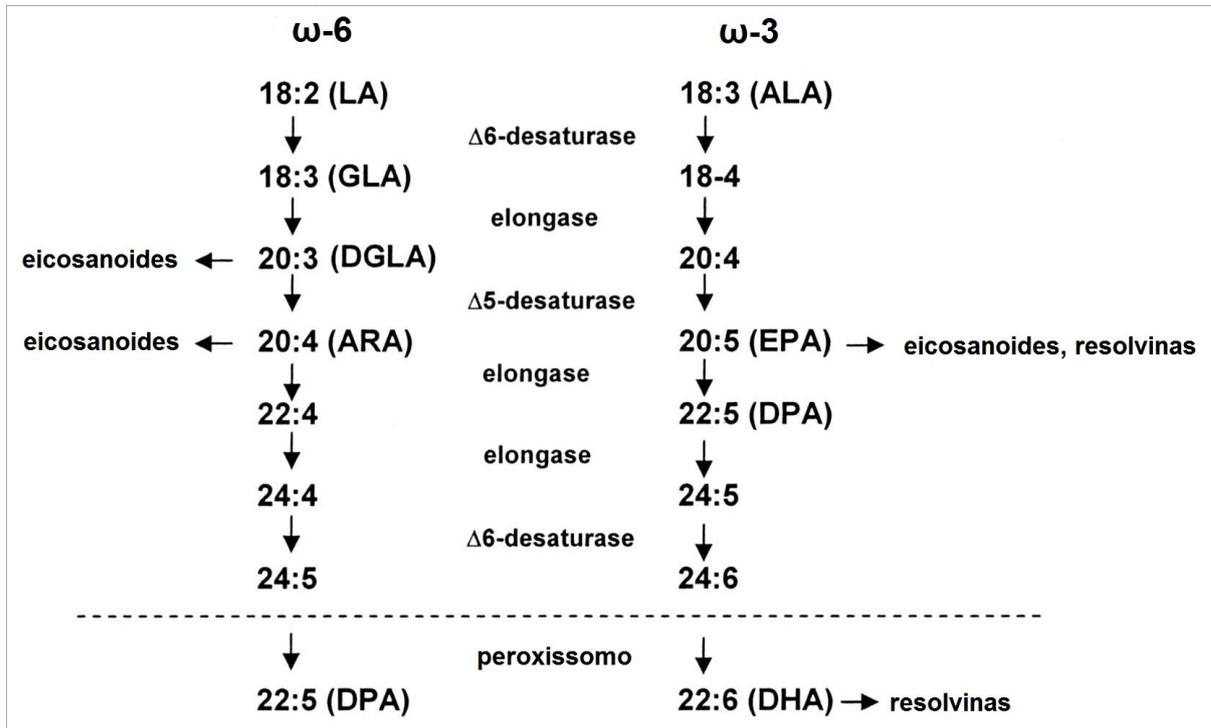
os AGPI ω -3 compartilham aspectos metabólicos com outro ácido pertencente à mesma família, porém com atuação oposta: o AGPI ω -6, nomeado como ácido linoleico (AL; 18:2 ω -6)¹⁹⁷.

Os ácidos ALA e AL são considerados essenciais, pois não podem ser sintetizados pelo organismo dos mamíferos devido à ausência das enzimas dessaturase Δ 12 e Δ 15, enquanto que plantas possuem tal capacidade^{198,199}. As algas marinhas do fitoplâncton conseguem gerar e alongar o ALA; considerando a cadeia alimentar, peixes que habitam águas frias se alimentam destas algas e, assim, enriquecem-se com ácidos graxos ω -3. Desta maneira, o óleo de peixe é um produto obtido a partir do processamento industrial da carne de peixes gordurosos ou do fígado de peixes magros. Espécies como salmão, atum, arenque, cavala, sardinha e bacalhau costumam ser opções com elevadas concentrações de ácidos graxos ω -3 e, conseqüentemente, utilizadas para a extração de óleo^{198,200}.

Além das algas e, por conseqüência, peixes marinhos, é possível encontrar ALA e AL em outras plantas. As fontes vegetais de ALA incluem folhas verdes, sementes oleaginosas, semente de linhaça, mostarda e óleo de soja. As fontes vegetais de AL também incluem sementes oleaginosas, além de sementes de abóbora e óleos vegetais derivados de algodão, milho, girassol, soja e canola²⁰¹.

Os mamíferos, no entanto, podem gerar outros ácidos graxos de maior cadeia carbônica a partir do ALA e AL, já que produzem a enzima-chave para a dessaturação e alongação de ácidos graxos, a Δ -6-dessaturase. Desta maneira, o organismo é capaz de gerar AGPI de cadeia muito longa (AGPCML) a partir do ALA, que são os ácidos eicosapentaenoico (EPA; 20:5 ω -3) e docosahexaenoico (DHA 22:6 ω -3), enquanto que a partir do AL origina-se o ácido araquidônico (ARA; 20:4 ω -6) (Figura 5)^{202,203}.

Figura 5 – Via bioquímica de interconversão dos ácidos graxos ω -6 e ω -3.



Legenda: LA ácido linoleico; GLA ácido gama-linolênico; DGLA ácido di-homo-gamalinolênico; ARA ácido araquidônico; DPA ácido docosapentaenóico; ALA ácido α -linolênico; EPA ácido eicosapentaenóico; DHA ácido docosaexaenóico. Fonte: Adaptado de Arterburn, Hall e Oken, 2006²⁰⁰.

Assim, entende-se que estes ácidos compartilham a enzima Δ -6-desaturase e, conseqüentemente, competem pela mesma via metabólica. Esta enzima possui maior afinidade pelo ALA, contudo a ingestão de AL em elevadas concentrações pode reduzir drasticamente a conversão do ALA em EPA e DHA²⁰⁴.

É possível sintetizar pequenas quantidades de EPA e DHA a partir do ALA presente nos alimentos. Contudo, diversos fatores prejudicam tal conversão, como elevada ingestão de gordura saturada e *trans*, carências nutricionais, tabagismo, infecções, estresse e envelhecimento²⁰¹. Ou seja, a ingestão de fontes com elevadas concentrações dos metabólicos ativos, como por exemplo o óleo de peixe, torna-se mais vantajosa²⁰⁵⁻²⁰⁷.

Os ácidos graxos ω -3 exercem seus efeitos modulando três vias principais e clássicas: 1) estrutura e função da membrana plasmática; 2) síntese de eicosanoides; e 3) expressão gênica²⁰⁸.

Por serem componentes essenciais da membrana celular, EPA e DHA interagem com outros componentes da membrana, em especial os fosfolípidos,

como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, aos quais os AGPI ω -3 são incorporados e impactam suas propriedades. Por exemplo, quando enriquecidos com ω -3, a estrutura tridimensional de tais ácidos graxos confere aos fosfolípidos uma conformação espacial que reduz a tensão da membrana celular e melhora a sua fluidez e permeabilidade²⁰⁹.

Após a suplementação, as concentrações de EPA e DHA nos fosfolípidos celulares aumentam às custas do ácido araquidônico. Isto é importante para a resposta inflamatória, tendo em vista que EPA pode ser metabolizado pela mesma enzima que metaboliza o ARA e gerar eicosanoides de séries alternativas²¹⁰. Tais eicosanoides possuem atividade inflamatória menos potente, por isso são comumente designados como anti-inflamatórios; um exemplo é o leucotrieno B5 (LTB5), derivado do EPA, o qual é 10-30 vezes menos potente em atrair neutrófilos, comparado ao LTB4 derivado do ARA^{202,211}.

Acredita-se que os AGPI ω -3 possam atuar na inflamação ao modular a ativação das células endoteliais e, conseqüentemente, o infiltrado de neutrófilos, durante o processo inflamatório²⁰². Os ácidos graxos ω -3 também podem modular o processo inflamatório devido à capacidade de ligação e ativação de fatores de transcrição e receptores de membrana ou citosólicos, como os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor*) e receptor 120 acoplado à proteína G (GPR120, do inglês *G-protein coupled receptor 120*), respectivamente, dada a capacidade do EPA e DHA em inibir fatores de transcrição de genes relacionados à produção de citocinas inflamatórias, como o NF- κ B²¹²⁻²¹⁴.

Outra possível ação dos AGPI ω -3 no controle da inflamação e que tem sido recentemente discutida relaciona-se à produção de mediadores pró-resolutivos (MPRs). Estes mediadores, também conhecidos como lipoxinas, maresinas, resolvinas e protectinas, são gerados a partir do metabolismo de EPA e DHA e atuam na fase resolutiva do processo inflamatório ao controlar a duração e a magnitude, além de estimular a restauração da homeostase^{196,215}.

Os AGPI ω -3, em especial o DHA, são essenciais para o adequado desenvolvimento e funcionamento cerebral¹⁹⁸. O DHA se acumula no cérebro e na retina, e alterações nas concentrações deste ácido graxo estão positivamente relacionadas com a performance cognitiva e o comportamento; ou seja, a deficiência deste nutriente pode afetar a neurogênese e reduzir o desenvolvimento neural.

Ademais, a conversão cerebral do ALA a DHA é extremamente baixa, em torno de 1%, por isso o DHA derivado da dieta ou da biossíntese hepática são imprescindíveis^{216,217}. O EPA, todavia, também é importante para o SNC, pois atua como um mensageiro para as células, tendo em vista seu rápido metabolismo; modula a plasticidade sináptica, pois ativa a via da PI3-kinase/Akt; e também favorece a mielinogênese²⁰⁹.

Os efeitos anti-inflamatórios do óleo de peixe rico em AGPI ω -3 têm sido avaliados em modelos animais de sepse. A administração intraperitoneal de emulsão lipídica à base de óleo de peixe (Omegaven® 10%; Fresenius Kabi) na dose de 1 g/kg, em camundongos ICR submetidos à indução por meio de CLP, reduziu marcadores de lesão renal aguda e modulou parâmetros inflamatórios, como a expressão gênica de PPAR²¹⁸. Esta mesma linhagem de camundongos foi avaliada para verificar o efeito do consumo de dieta enriquecida com óleo de peixe (2,5% de OP) em lesão hepática decorrente de sepse. Como resultado, os autores observaram redução de citocinas inflamatórias séricas, redução de infiltrado de neutrófilos no fígado e modulação na expressão gênica de fatores de transcrição, como PPAR e NF- κ B²².

Em ratos *Sprague-Dawley* submetidos à indução de sepse por CLP, o tratamento com nutrição parenteral via cateter central enriquecida com emulsão lipídica à base de óleo de peixe (Omegaven® 10%; Fresenius) reduziu os scores de pontuação para classificação de lesão pulmonar aguda e a carga bacteriana no fluido de lavagem peritoneal, modulou subpopulações de linfócitos e diminuiu as concentrações de citocinas plasmáticas²³. Por meio do mesmo modelo experimental, diferentes pesquisadores avaliaram a influência do óleo de peixe na sinalização da via SphK1/S1P, necessária para a síntese de mediadores inflamatórios, e concluíram que o uso de óleo de peixe modula esta via e reduz o processo inflamatório²¹⁹.

Os efeitos da administração de dieta enteral enriquecida com óleo de peixe sobre o metabolismo hepático foram avaliados em ratos *Lewis* machos submetidos à sepse por endotoxemia. Observou-se que o consumo de óleo de peixe preveniu o desenvolvimento de esteatose hepática não-alcoólica nos animais com sepse²²⁰.

Em um ensaio clínico randomizado piloto, realizado com 60 indivíduos com sepse, observou-se que o uso parenteral de emulsão lipídica à base de óleo de

peixe apresenta segurança, reduz parâmetros de disfunção orgânica e também mortalidade²²¹.

Apesar de sua relevância para a saúde do SNC, a literatura científica apresenta dados insuficientes a respeito do papel do óleo de peixe rico em AGPI ω -3 sobre alterações da função cerebral, especialmente na sepse, sendo enfatizado o efeito deste nutracêutico em funções periféricas.

1.1.6 Modelos animais de sepse

Modelos animais desempenham um papel crucial para o aprofundamento teórico acerca de doenças e síndromes, pois permitem a replicação destas e a investigação de mecanismos de ação para o desenvolvimento de terapias e drogas²²². É fundamental que um modelo reproduza as condições relevantes para a progressão fisiopatológica da doença, as quais são visualizadas em seres humanos. Considerando a sepse, o modelo ideal deve mimetizar a ocorrência de hipotensão, vasodilatação, elevação do débito cardíaco, resposta ao tratamento e mortalidade, todos observados em pacientes sépticos²²³.

De maneira resumida, os modelos atuais podem ser categorizados entre não-cirúrgicos e cirúrgicos. Dentre os não-cirúrgicos, são utilizados os modelos de toxemia (o qual consiste na administração de agonistas do receptor *Toll-Like*), e de administração de patógenos viáveis, como bactérias. Estes modelos possuem como características a facilidade de execução e reprodutibilidade e menores custos financeiros, no entanto indicam mecanismos de resposta inflamatória do hospedeiro frente aos patógenos e estímulos do sistema imune, sem mimetizar, de fato, as condições fisiopatológicas apresentadas por pacientes com sepse em virtude de uma infecção²²⁴⁻²²⁶.

Com relação aos modelos cirúrgicos, existem os modelos de implantação (consistindo na implantação de um coágulo de fibrina na cavidade peritoneal), de *Colon ascendens stent peritonitis* – CASP (implica na colocação cirúrgica de um stent no cólon ascendente, permitindo o extravasamento de conteúdo fecal para o peritônio e, assim, incitando um quadro infeccioso de peritonite)²²⁷ e de ligação e perfuração cecal – CLP (similar ao CASP, consiste na ligação intestinal e perfuração local para permitir o extravasamento de bolo fecal e induzir a peritonite)^{222,224,225}. A utilização de meios cirúrgicos para indução de sepse mostra-se mais relevante, pois

cria-se um foco infeccioso específico que pode estimular a resposta imune sistêmica. Ademais, simulam de maneira mais fidedigna o cenário fisiopatológico visualizado em humanos^{224,228}.

Frente a isso, o modelo de indução CLP tem sido amplamente utilizado em virtude de sua capacidade de simular, com mais fidedignidade, a sepse em humanos, quando comparado aos demais modelos atualmente disponíveis. Sendo assim, considera-se a indução de sepse por meio de ligação e perfuração cecal o modelo padrão-ouro^{229,230}.

1.1.6.1 Ligação e perfuração cecal (CLP)

O modelo de indução CLP foi descrito por Wichterman et al. (1980)²³¹ e baseia-se na ligação do ceco abaixo da válvula íleo-cecal, perfuração do ceco com tamanho padronizado e extrusão do conteúdo fecal para a cavidade peritoneal. Este modelo envolve a combinação de três diferentes insultos orgânicos: trauma tecidual causado pela laparotomia; necrose decorrente da ligação cecal; e infecção devido ao extravasamento de fezes no peritônio²²⁹. Tendo em vista que o ceco é uma porção intestinal com elevada carga bacteriana, a perfuração desta região resulta em peritonite polimicrobial (em especial, Gram-negativa), translocação de bactérias para a corrente sanguínea, choque séptico, disfunção orgânica e morte²³⁰.

Por meio da reposição volêmica realizada ao final do procedimento cirúrgico, os animais apresentam alterações hemodinâmicas características da sepse, que incluem uma fase inicial hiperdinâmica – definida por uma massiva produção de citocinas inflamatórias e ERO, alteração da permeabilidade vascular e função cardíaca, culminando na falência de órgãos – e uma fase secundária hipodinâmica – caracterizada por um processo anti-inflamatório no qual há alteração na apresentação de antígenos, redução na proliferação e função de linfócitos e aumento de apoptose, culminando em imunossupressão^{228,232}.

Além disto, este modelo possibilita o estudo de condições em longo prazo, já que animais sobreviventes à lesão inicial apresentam longa sobrevivência após a recuperação. Também, o curso da doença neste modelo permite a avaliação de respostas tardias do sistema imune, as quais podem estar alteradas em indivíduos sobreviventes da sepse²²³.

Outras vantagens deste método incluem a simplicidade, reprodutibilidade e possibilidade de controlar o grau de contaminação bacteriana, a severidade da sepse, e conseqüentemente, a mortalidade, pela mudança do calibre da agulha, número de perfurações realizadas no ceco e extensão da ligação cecal^{226,230,232,233}.

Sendo assim, o modelo de CLP satisfaz diversos critérios de similaridade com a condição em seres humanos, que são a presença de um foco infeccioso localizado, de natureza polimicrobial, com bactérias oriundas do próprio animal (o que acontece na peritonite em humanos) e a liberação de produtos bacterianos que levam à septicemia^{225,229}.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos isolados e associados de óleo de peixe e ácido α -lipoico em cultura celular de micróglia e sobre a disfunção cerebral na sepse em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os efeitos isolados e associados de óleo de peixe e ácido α -lipoico sobre as concentrações de citocinas TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-18 e INF- γ em cultura primária de micróglia estimulada com lipopolissacarídeo;
- Determinar os efeitos isolados e associados de óleo de peixe e ácido α -lipoico sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica no córtex total, hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de sepse por ligação e perfuração cecal, 12 e 24 horas após o procedimento;
- Determinar os efeitos isolados e associados de óleo de peixe e ácido α -lipoico sobre as concentrações de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 no córtex total, hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de sepse por ligação e perfuração cecal, 12 e 24 horas após o procedimento;
- Definir os efeitos isolados e associados de óleo de peixe e ácido α -lipoico sobre a atividade da mieloperoxidase no córtex total, hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de sepse por ligação e perfuração cecal, 12 e 24 horas após o procedimento;
- Averiguar os efeitos isolados e associados de óleo de peixe e ácido α -lipoico sobre a concentração de nitrito/nitrato no córtex total, hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de sepse por ligação e perfuração cecal, 12 e 24 horas após o procedimento;

- Estimar os efeitos isolados e associados de óleo de peixe e ácido α -lipoico sobre a peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e atividade de enzimas antioxidantes no córtex total, hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de sepse por ligação e perfuração cecal, 12 e 24 horas após o procedimento;

- Verificar os efeitos isolados e associados de óleo de peixe e ácido α -lipoico sobre as concentrações de BDNF e NGF no córtex total, hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de sepse por ligação e perfuração cecal, 10 dias após o procedimento;

- Avaliar os efeitos isolados e associados de óleo de peixe e ácido α -lipoico sobre a memória e aprendizado em ratos submetidos ao modelo de sepse por ligação e perfuração cecal, 10 dias após o procedimento;

- Avaliar os efeitos isolados e associados de óleo de peixe e ácido α -lipoico sobre a sobrevivência de ratos submetidos ao modelo de sepse por ligação e perfuração cecal.

CAPÍTULO 3: MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental pré-clínico utilizando modelo animal de doença.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

As avaliações experimentais e comportamentais foram realizadas no Biotério Central da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), campus Tubarão - SC. As análises neuroquímicas foram realizadas no Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, da mesma universidade, e no Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul de Santa Catarina (UNESC). As análises para cultura celular foram realizadas no Laboratory of Biomarkers e no Laboratory of Neurochemistry, na University of Texas Health Sciences Center at Houston (UTHealth).

As análises neuroquímicas foram realizadas utilizando reagentes específicos por técnicas: Ácido 2-tiobarbitúrico $\geq 98\%$, Sigma Aldrich®; Brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB); Catalase, Sigma Aldrich®; Adrenalina, Sigma Aldrich®; Albumina bovina, $\geq 98\%$; Cloridrato de Xilazina 2%, Syntec, BR; Cloridrato de Cetamina 10%, Syntec, BR; Reagentes, medicamentos e meios de cultura para avaliações *in vitro*, ScienCell, EUA; Kits de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de citocinas para ratos, Bio-Rad Laboratories, EUA e Peprotech, BR; Kit para determinação de neurotrofinas, Chemicon, EUA, e R&D Systems, EUA. Todos os reagentes utilizados foram de grau de alta pureza.

Para avaliação da memória e habituação utilizou-se o aparato de campo aberto (medindo 40 x 60 cm e delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo três de madeira e uma de vidro transparente, com o piso dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas).

3.3 ANIMAIS

Para a elaboração da cultura primária de microglia foram utilizados os filhotes de 8 ratos Wistar com 1 a 3 dias de vida. Para as demais análises, foram avaliados 483 ratos *Wistar* machos adultos (60 dias, 220-310 g). Os animais foram provenientes do biotério da Universidade do Vale do Itajaí e foram alojados no biotério da UNISUL, em caixas de polipropileno de dimensões adequadas, com maravalha, em ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas controlado por *timer*, recebendo água e dieta padrão *ad libitum* durante todo o período de experimento.

3.4 CULTURA PRIMÁRIA DE MICROGLIA

As análises *in vitro* foram realizadas em parceria com o Laboratory of Biomarkers e o Laboratory of Neurochemistry, localizados no Department of Psychiatry & Behavioral Sciences, McGovern Medical School, University of Texas Health Sciences Center at Houston – UTHealth. A cultura primária mista de células gliais foi preparada a partir do cortex cerebral de ratos *Wistar* com 1 - 3 dias de idade^{234,235}. As meninges foram cuidadosamente removidas e o tecido encefálico remanescente foi mantido em tubos Falcon com meio de cultura para micróglia (ScienCell, CA, EUA), no gelo, durante todo o procedimento de obtenção dos tecidos. Após o conteúdo dos tubos foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta automática de 4 mL, adicionou-se tripsina e deixou-se incubar em incubadora de CO₂ a 37 °C por 15 minutos. A reação foi cessada com um inibidor de tripsina e os tubos centrifugados por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e distribuído em frascos de cultura com meio para micróglia. Os frascos foram mantidos em confluência durante 12 a 15 dias em incubadora de CO₂ a 37 °C, sendo que os meios de cultura foram trocados a cada 3 dias. Ao final do período de confluência, os frascos foram agitados em agitador automático para desprender as células microgliais que estivessem aderidas ao frasco. As micróglias obtidas foram plaqueadas em placas de 6 poços, em densidade de $0,1 \times 10^6$ céls/cm², e mantidas em incubadora de CO₂ a 37 °C durante 24 horas para garantir a aderência à placa. Posteriormente, as placas foram utilizadas para a realização dos testes *in vitro*.

3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO

3.5.1. Indução de sepse

A sepse intra-abdominal foi produzida usando a técnica CLP²³⁶ para indução de sepse moderada²³⁷. Os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal. O ceco foi exposto, ligado com fio seda 3-0 na metade de seu comprimento abaixo da junção íleo-cecal, perfurado uma vez com uma agulha de calibre nº 14 e gentilmente comprimido até a extrusão de conteúdo fecal. Os planos cirúrgicos foram fechados e os ratos observados por 2 horas. Imediatamente após o procedimento, todos os grupos receberam solução salina (50 mL/kg), dipirona (80 mg/kg) e ceftriaxona (30 mg/kg) por via subcutânea (S.C.) sendo os dois últimos administrados novamente 12 horas após a cirurgia. Como controle, foram avaliados animais submetidos a laparotomia, porém sem ligação ou perfuração cecal (animais sham). Para minimizar a variabilidade entre os diferentes experimentos, o procedimento CLP foi realizado sempre pelo mesmo pesquisador.

3.5.2. Tratamento e grupos experimentais

Para determinação da eficácia dos nutracêuticos e posterior análise do uso associado, o protocolo experimental foi dividido conforme segue:

3.5.2.1. In vitro

- **Concentração de citocinas em microglias ativadas por LPS**

Após o plaqueamento, as culturas de microglias foram co-tratadas durante 24 horas²³⁸ com LPS (*Escherichia coli* serotype 055:B5; 100 µg/mL) e ALA (200 µmol)²³⁹, ou LPS e OP (100 µmol)²⁴⁰, ou associados (LPS, ALA e OP, todos nas mesmas concentrações do uso isolado). Após o período, as células foram coletadas e processadas para as análises de determinação de citocinas usando kit comercial Bio-Plex Pro™ Rat Cytokine 23-Plex Assay (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA), conforme as recomendações do fabricante. A análise foi realizada em um sistema Bio-Plex 200 e os resultados foram expressos em pg/mg de proteína.

3.5.2.2. In vivo

- **Experimento 1: Verificação do efeito isolado do ácido α -lipoico**

Os grupos foram aleatoriamente divididos em: Sham+Sal, Sham+ALA, CLP+Sal e CLP+ALA. O ácido R- α -lipoico $\geq 99\%$ (Lemma Suply Solutions, Brasil) foi ofertado via oral, por meio de gavagem, na dose de 200 mg/kg diluído em salina, totalizando 1 mL²¹. Para a realização das análises em 12 e 24 horas, a administração de ALA ocorreu imediatamente antes da anestesia, a fim de garantir a deglutição. Para a realização das análises em 10 dias, a administração de ALA foi realizada imediatamente antes da anestesia e 24 horas posteriores à cirurgia.

Para as análises bioquímicas, foram inseridos nos grupos experimentais sete animais em cada grupo Sham e 10 animais em cada grupo CLP, totalizando 34 animais em cada tempo avaliado (12 e 24 horas). Para a análise da permeabilidade da BHE, foram inseridos nos grupos experimentais sete animais em cada grupo Sham e 10 animais em cada grupo CLP, totalizando 34 animais. Para as análises de sobrevivência e de testes comportamentais foram inseridos nos grupos experimentais 13 animais em cada grupo Sham e 20 animais em cada grupo CLP, totalizando 66 animais.

- **Experimento 2: Verificação do efeito isolado do óleo de peixe**

Os grupos foram aleatoriamente divididos em: Sham+Sal, Sham+OP, CLP+Sal e CLP+OP. O óleo de peixe (Omegaven[®] 10%, Fresenius Kabi Brasil) foi ofertado via oral, por meio de gavagem, na dose de 600 μ L/kg²⁴¹. De acordo com o fabricante, esta dose ofertou de 0,0075 g a 0,0169 g de EPA e de 0,0086 g a 0,0185 g de DHA. Para a realização das análises em 24 horas, a administração de óleo de peixe ocorreu imediatamente antes da anestesia e 12 horas após a cirurgia. Para a realização das análises em 10 dias, a administração de óleo de peixe foi realizada diariamente e durou nove dias, começando imediatamente antes da anestesia.

Para as análises bioquímicas, foram inseridos nos grupos experimentais sete animais em cada grupo Sham e 10 animais em cada grupo CLP, totalizando 34 animais. Para a análise da permeabilidade da BHE, foram inseridos nos grupos experimentais sete animais em cada grupo Sham e 10 animais em cada grupo CLP, totalizando 34 animais. Para as análises de sobrevivência e de testes comportamentais

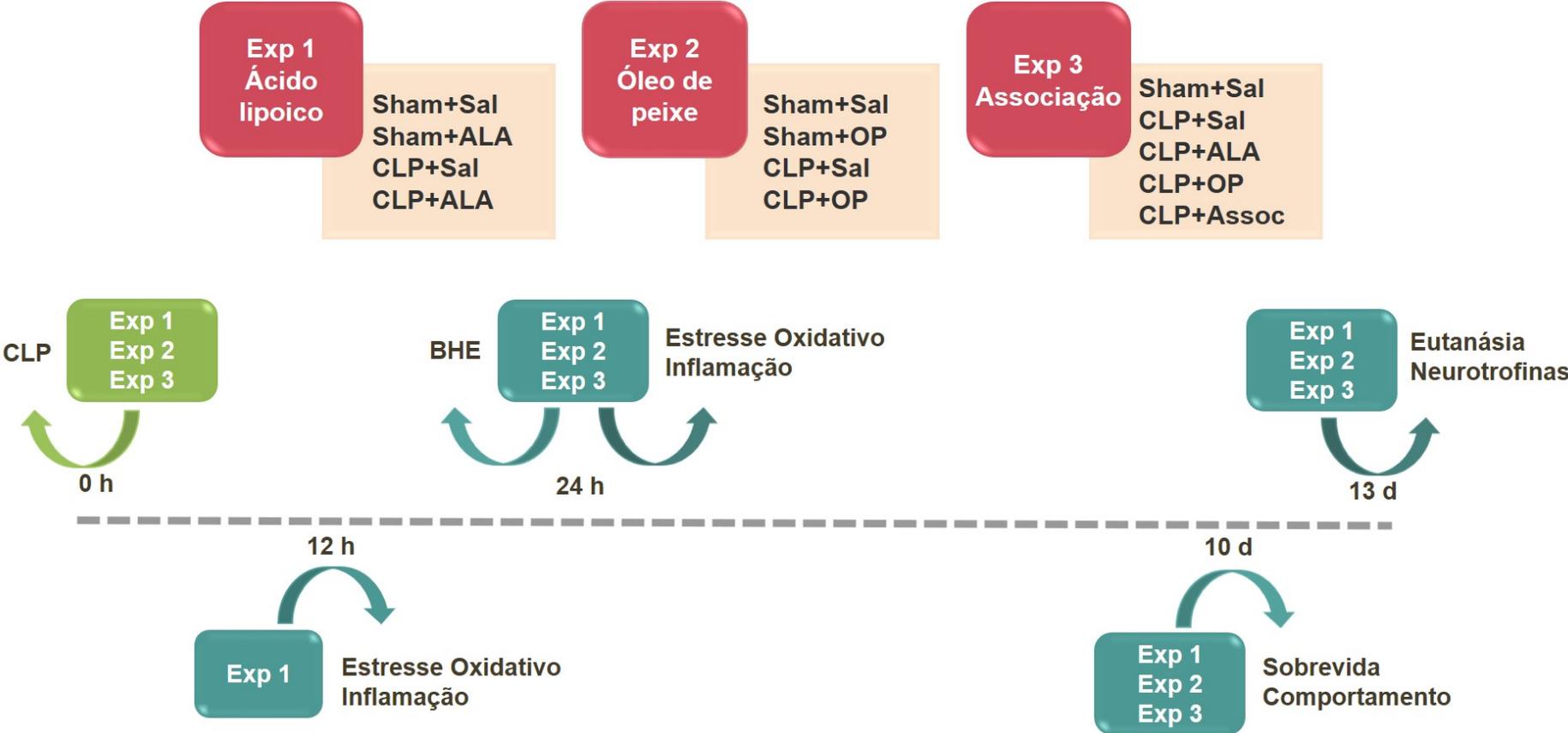
foram inseridos nos grupos experimentais 13 animais em cada grupo Sham e 20 animais em cada grupo CLP, totalizando 66 animais.

- **Experimento 3: Verificação do efeito da associação de ácido α -lipoico e óleo de peixe**

Os grupos foram aleatoriamente divididos em: Sham+Sal, CLP+Sal, CLP+ALA, CLP+OP e CLP+Assoc. O grupo CLP+Assoc recebeu o tratamento associado de ácido lipoico (na dose de 200 mg/kg diluído em salina, totalizando 1 mL²¹) e de óleo de peixe (na dose de 600 μ L/kg²⁴¹).

Para as análises bioquímicas, foram inseridos nos grupos experimentais sete animais em cada grupo Sham e 10 animais em cada grupo CLP, totalizando 47 animais. Para a análise da permeabilidade da BHE, foram inseridos nos grupos experimentais sete animais em cada grupo Sham e 10 animais em cada grupo CLP, totalizando 47 animais. Para as análises de sobrevivência e de testes comportamentais foram inseridos nos grupos experimentais 13 animais em cada grupo Sham e 20 animais em cada grupo CLP, totalizando 87 animais.

Figura 6 – Metodologia do estudo *in vivo*.



Legenda: ALA ácido α -lipoico; Assoc associação; BHE barreira hematoencefálica; CLP ligação e perfuração cecal; Exp experimento; OP óleo de peixe; Sal salina. Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

3.6 ANÁLISE DE SOBREVIDA

Na avaliação da sobrevivência, 10 animais de cada grupo foram observados diariamente durante 10 dias após indução de sepse para verificar a taxa de mortalidade²⁴².

3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.7.1 Coleta de amostras

Para coleta das amostras, os animais sofreram morte indolor assistida por overdose de tiopental (0,5 g/Kg) e decaptação por guilhotina para coleta das amostras biológicas. As estruturas cerebrais hipocampo, córtex pré-frontal e córtex total (tecido encefálico remanescente após retirada do hipocampo e córtex pré-frontal) foram cuidadosamente dissecadas, armazenadas em tubos do tipo Eppendorf e mantidas sob refrigeração em freezer -80 °C até posterior análise.

3.7.2 Determinação de citocinas

As concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram determinadas pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), usando kits comerciais (Peprotech, Brasil). O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e a leitura foi realizada em 450 nm na leitora de microplacas (SPECTRAMAX, Molecular Devices, USA). Os resultados foram expressos em pg/mg de proteína.

3.7.3 Determinação de BDNF e NGF

Para o experimento em que o efeito isolado do ALA foi testado, as concentrações de BDNF e NGF¹³ foram determinadas pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) sanduíche utilizando os kits ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) e ChemiKine™ Nerve Growth Factor (NGF), seguindo as instruções do fabricante (ChemiKine™, Chemicon, EUA). As amostras foram homogeneizadas, diluídas em solução diluente na proporção de 1:2 e encubadas em placas de 96 micropoços por 24 horas. A curva padrão variando entre 7,8 a 500 pg de BDNF ou

NGF foi realizada. Posteriormente, as placas foram lavadas quatro vezes com solução diluente e encubadas durante três horas em temperatura ambiente com anticorpos monoclonais de coelho anti-BDNF e anti-NGF. Após nova lavagem, as placas foram novamente encubadas por uma hora com anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase diluído em 1:1000. Depois da adição do conjugado enzima-estreptavidina, substrato e solução de parada, a quantidade de BDNF ou NGF foi determinada em leitura no espectrofotômetro em 450 nm. Os resultados foram expressos em mBDNF ou m NGF/mg de proteína.

Para os experimentos em que foram testados os efeitos isolados do óleo de peixe e os efeitos da associação de ALA e óleo de peixe, as concentrações de BDNF foram determinadas pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) sanduíche utilizando o kit Human/Mouse BDNF DuoSet ELISA (Cat. DY248), seguindo as instruções do fabricante (R&D Systems, EUA). As amostras foram homogeneizadas e manipuladas conforme a recomendação metodológica do fabricante. A sensibilidade do ensaio variou entre 23,4 e 1500 pg/mL e os valores obtidos foram estimados pela interpolação da curva padrão em um ensaio colorimétrico. A leitura foi realizada em um aparelho leitor de ELISA (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China)²⁴³ em 450 nm (com correção em 540 nm). Os resultados foram expressos em pg/mg de proteína.

3.7.4 Avaliação da atividade da mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi utilizada como indicativo do infiltrado de neutrófilos tecidual²⁴⁴. Neste sentido, as amostras foram homogeneizadas em 0.5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugadas. A suspensão foi homogeneizada manualmente até a obtenção do sobrenadante. Uma alíquota do sobrenadante foi misturada com uma solução de 1,6 mM tetrametilbenzidina (TMB) e 1 mM H₂O₂. A atividade da MPO foi mensurada espectrofotometricamente em 650 nm a 37 °C. Os resultados foram expressos como mU/mg de proteína²⁴⁵.

3.7.5 Determinação da permeabilidade da barreira hematoencefálica

A integridade da barreira hematoencefálica foi determinada por meio da técnica de extravasamento do corante azul de Evans²⁴⁶. Os animais receberam a solução de corante na concentração de 1% (diluído em solução salina), na dose de 4 mL/kg, por via intravenosa (veia femoral). Após 60 minutos, os animais foram anestesiados i.p. com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) para a realização de laparotomia e perfusão cardíaca. Injetou-se solução salina no ventrículo esquerdo à pressão de 100 mmHg até a obtenção de fluido incolor a partir do átrio direito. Imediatamente após os animais foram decaptados em guilhotina.

As estruturas cerebrais córtex total, hipocampo e cortex pré-frontal foram retiradas para avaliação da BHE e colocadas em solução tricloroacético a 50%. Após homogeneização e centrifugação, o sobrenadante obtido foi diluído em etanol (1:3) para a determinação da intensidade de sua fluorescência (excitação em 620 nm e emissão em 680 nm) com um espectrofotômetro de luminescência. O teor de azul de Evans nos tecidos foi quantificado a partir de uma linha padrão linear derivada de quantidades conhecidas do corante e expressa em ng/mg de tecido.

3.7.6 Determinação de nitrito/nitrato

A concentração de nitrito/nitrato foi mensurada por meio da utilização da reação de Griess, por adição de 100 µL de reagente de Griess [0,1% (w/v) naftil etilenodiaminadichloridrato em H₂O e 1% (p/v) sulfanilamida em 5% (v/v) H₃PO₄ em volume concentrado (1:1)] para 100 µL de amostra. A densidade óptica foi medida a 550 nm usando um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como nmol/mg de proteína²⁴⁷.

3.7.7 Avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A formação de TBARS durante uma reação ácida de aquecimento foi utilizada como marcador de peroxidação lipídica²⁴⁸. Resumidamente, as amostras foram misturadas com 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%, e, em seguida, aquecidas em banho de água fervente a 100 °C durante 30 minutos. TBARS foram determinadas pela absorbância a 535 nm,

utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído (MDA)/mg de proteína.

3.7.8 Avaliação de carbonilação protéica

O efeito do estresse oxidativo em proteínas foi avaliado por meio da determinação de grupos carbonil baseado na reação com dinitrofenilhidrazina. Resumidamente, as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina, e a absorbância foi aferida em 370 nm. Os resultados foram expressos em concentração de proteínas carboniladas/mg de proteína²⁴⁹.

3.7.9 Determinação da atividade da superóxido dismutase

A atividade enzimática da superóxido dismutase foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina. As amostras teciduais foram homogeneizadas em 1 mL de tampão glicina e centrifugadas por 10 min em 3000 rpm, em temperatura ambiente. O reagente branco foi preparado a partir da mistura de 10 µL de catalase na concentração de 0,0024 g/mL com 970 µL de tampão glicina a 32 °C. Após, foi adicionada a quantidade de 17 µL de adrenalina 60 mM. A leitura do reagente foi será realizada a cada 10 segundos, durante 180 segundos, a fim de determinar a curva de calibração. Este processo foi repetido após a leitura de quatro amostras e sempre que houve a troca de reagentes. As amostras foram preparadas a partir da mistura de 10 µL de catalase 0,0024 g/mL, 3, 5 ou 7 µL de amostra e 970 µL de tampão glicina a 32 °C. A leitura da amostra foi realizada a cada 10 segundos, durante 180 segundos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de lâmpada de deutério, em cubetas de plástico, a 480 nm. A atividade da SOD foi expressa em U de SOD/mg de proteína²⁵⁰.

3.7.10 Determinação da atividade da catalase

A atividade enzimática da catalase foi determinada pela diminuição no consumo de peróxido de hidrogênio. As amostras teciduais foram homogeneizadas em 1 mL de tampão catalase e centrifugadas por 10 min em 3000 rpm, em

temperatura ambiente. O reagente branco foi preparado a partir da mistura de 100 µL de sobrenadante da amostra com 1 mL de tampão catalase e foi utilizado para zerar o espectrofotômetro. O reagente amostra foi preparado a partir da mistura de 100 µL de sobrenadante da amostra com 1 mL de tampão catalase contendo H₂O₂ (25 mL de tampão catalase e 400 µL de H₂O₂, protegido da luz). A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro de lâmpada de deutério, em cubetas de quartzo, a 240 nm, nos tempos 0, 30 e 60 segundos. A atividade da CAT foi expressa em U de CAT/mg de proteína²⁵¹.

3.7.11 Determinação de proteínas totais

Os resultados das análises bioquímicas foram normalizados com a quantidade de proteínas avaliada de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores²⁵². Para os resultados de BDNF referentes aos experimentos com o uso isolado de OP e com o uso associado de ALA e OP a normalização foi realizada de acordo com o método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA)²⁵³. Em ambos os métodos foi utilizada albumina do soro bovino como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em 700 nm e os resultados foram expressos em mg de proteína.

3.8 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados 10 dias após a indução de sepse, a fim de verificar os efeitos sobre a memória e aprendizado³.

3.9.1 Habituação ao campo aberto

A memória de habituação foi avaliada pelo teste de habituação ao campo aberto (*Open Field*). O procedimento foi realizado em um aparato chamado campo aberto, medindo 40x60 cm e delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo três de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto foi dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, individualmente, a partir do qual exploraram livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão

de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repetiu o mesmo procedimento. Os números de cruzamentos através das linhas pretas e o número de “rearings” (levantar-se nas patas traseiras) foram avaliados em ambas as sessões²⁵⁴.

3.9.2 Reconhecimento de objetos

A memória de reconhecimento de objetos foi testada no mesmo aparato (*Open Field*) conforme a descrição a seguir. No primeiro dia realizou-se a habituação, onde o animal foi colocado cuidadosamente no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos sem nenhum objeto. O primeiro dia serviu como habituação do animal ao espaço do aparelho. Vinte e quatro horas depois o animal foi recolocado no aparelho, no qual estavam dois objetos iguais (forma, tamanho e cor), objeto A e objeto B, posicionados em dois cantos adjacentes a 10 cm da parede, e então contou-se o tempo que o animal explorou cada objeto (A e B). No mesmo dia, 1 hora e 30 minutos depois, testou-se a memória de curta duração (STM, do inglês *short-term memory*), quando o animal explorou novamente o ambiente na presença do primeiro objeto familiar (objeto A) e o novo objeto (objeto C), e então contou-se novamente o tempo total que o animal explorou cada objeto. No dia seguinte (24 horas após), avaliou-se a memória de longa duração (LTM, do inglês *long-term memory*), quando foi feito o mesmo procedimento, mas trocando o objeto C pelo objeto D (diferente do objeto A) e então contou-se o tempo de exploração de cada objeto. Todos os objetos apresentaram textura (lisa) e tamanho (150-200 gramas) semelhante, mas formas diferentes. Neste teste aplicou-se o índice de reconhecimento, a fim de se calcular o tempo gasto para cada animal para explorar o objeto, expresso como uma razão ($TB/(TA+TB)$), onde TA = tempo gasto para explorar o objeto familiar; e TB = tempo gasto para explorar o novo objeto²⁵⁵.

3.9 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística dos dados e a elaboração de gráficos foram realizadas no programa estatístico Graphpad Prism® versão 5.0.

Para avaliação da distribuição dos dados foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis neuroquímicas e referentes ao teste comportamental de habituação ao campo aberto foram apresentadas como média \pm desvio-padrão ou média \pm erro padrão e analisadas pela análise de variância de uma via (*one way* - ANOVA) seguido de *post hoc* de Tukey. As variáveis referentes ao teste comportamental de reconhecimento de objetos foram apresentadas como mediana [intervalo interquartil] e a análise foi realizada usando os testes Mann-Whitney e Wilcoxon. A análise da sobrevivência foi avaliada por meio do teste de Kaplan Meier e teste *log rank*. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3.10 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina – Unisul, recebendo o parecer de aprovação (protocolo 15.043.4.01.IV). O estudo *in vitro* foi submetido ao Animal Welfare Committee Animal Research da University of Texas Health Sciences Center at Houston, recebendo o parecer de aprovação (protocolo AWC-15-0056). A utilização dos animais seguiu os princípios da lei Arouca - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos - DBCA-2013.

CAPÍTULO 4: ADMINISTRAÇÃO ISOLADA DE ÁCIDO α -LIPOICO

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Determinações em 12 e 24 horas

4.1.1.1. Permeabilidade da barreira hematoencefálica

A permeabilidade da BHE em 12 horas e 24 horas está representada nas Figuras 7A e 7B, respectivamente. Observou-se alteração na permeabilidade nas estruturas hipocampo e córtex pré-frontal dos animais com sepse (grupo CLP+sal), em comparação ao grupo controle (Sham+sal), somente no tempo de 24 horas após a indução de sepse. O tratamento com ALA diminuiu significativamente esta alteração no hipocampo dos animais com sepse (grupo CLP+ALA).

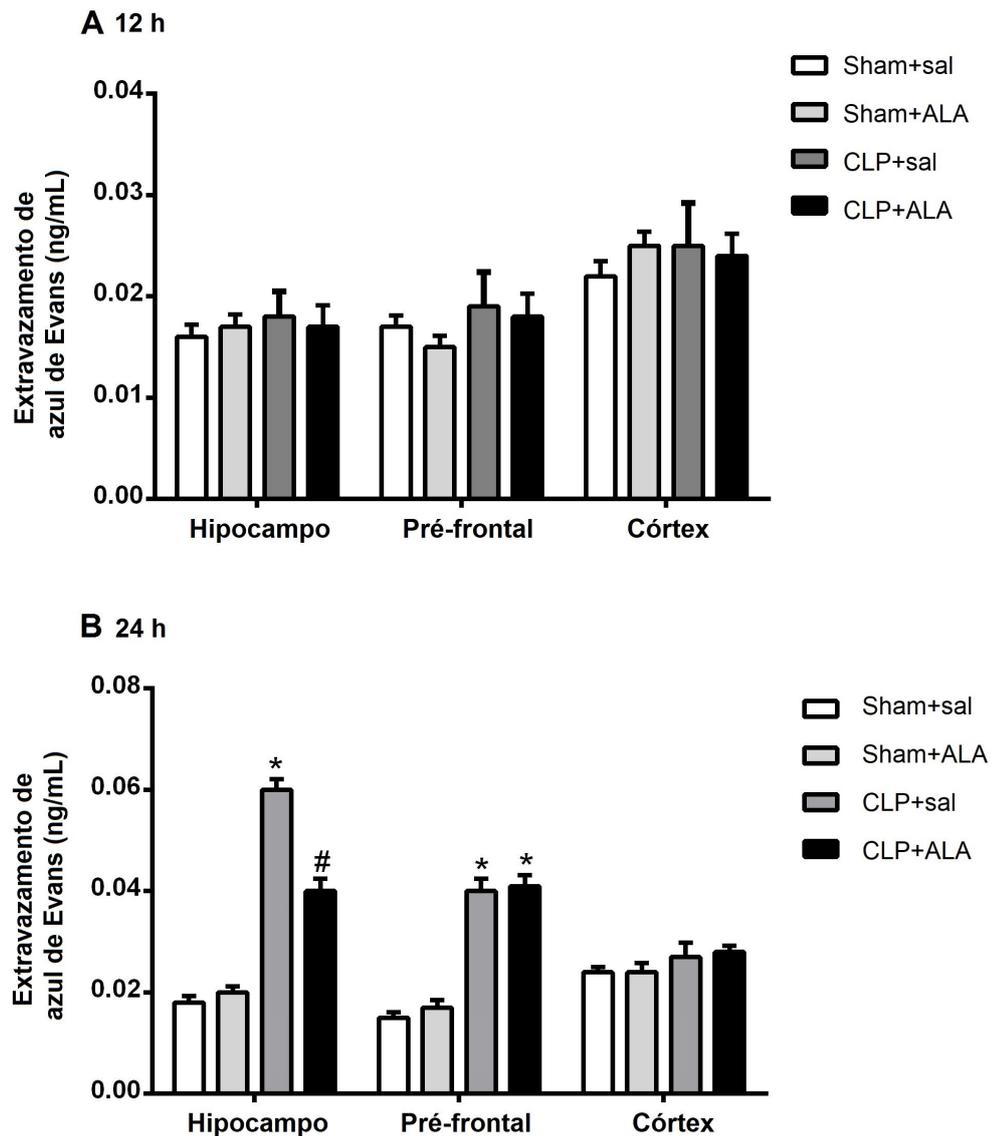


Figura 7 – Permeabilidade da barreira hematoencefálica em 12 horas (A) e 24 horas (B) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex total de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal.

4.1.1.2. Concentração de citocinas

As Figuras 8A e 8B ilustram as concentrações de TNF- α nas estruturas cerebrais em 12 horas e 24 horas após a indução de sepse. A indução de sepse (grupo CLP+sal) elevou as concentrações de TNF- α em todas as estruturas no tempo de 12 horas, e o tratamento com ALA diminuiu esta elevação no hipocampo e

córtex pré-frontal dos animais do grupo CLP+ALA. No tempo de 24 horas, as concentrações desta citocina permaneceram elevadas no hipocampo e no córtex total dos animais do grupo CLP+sal, enquanto que o tratamento com ALA reduziu estes valores no hipocampo dos ratos com sepse (grupo CLP+ALA).

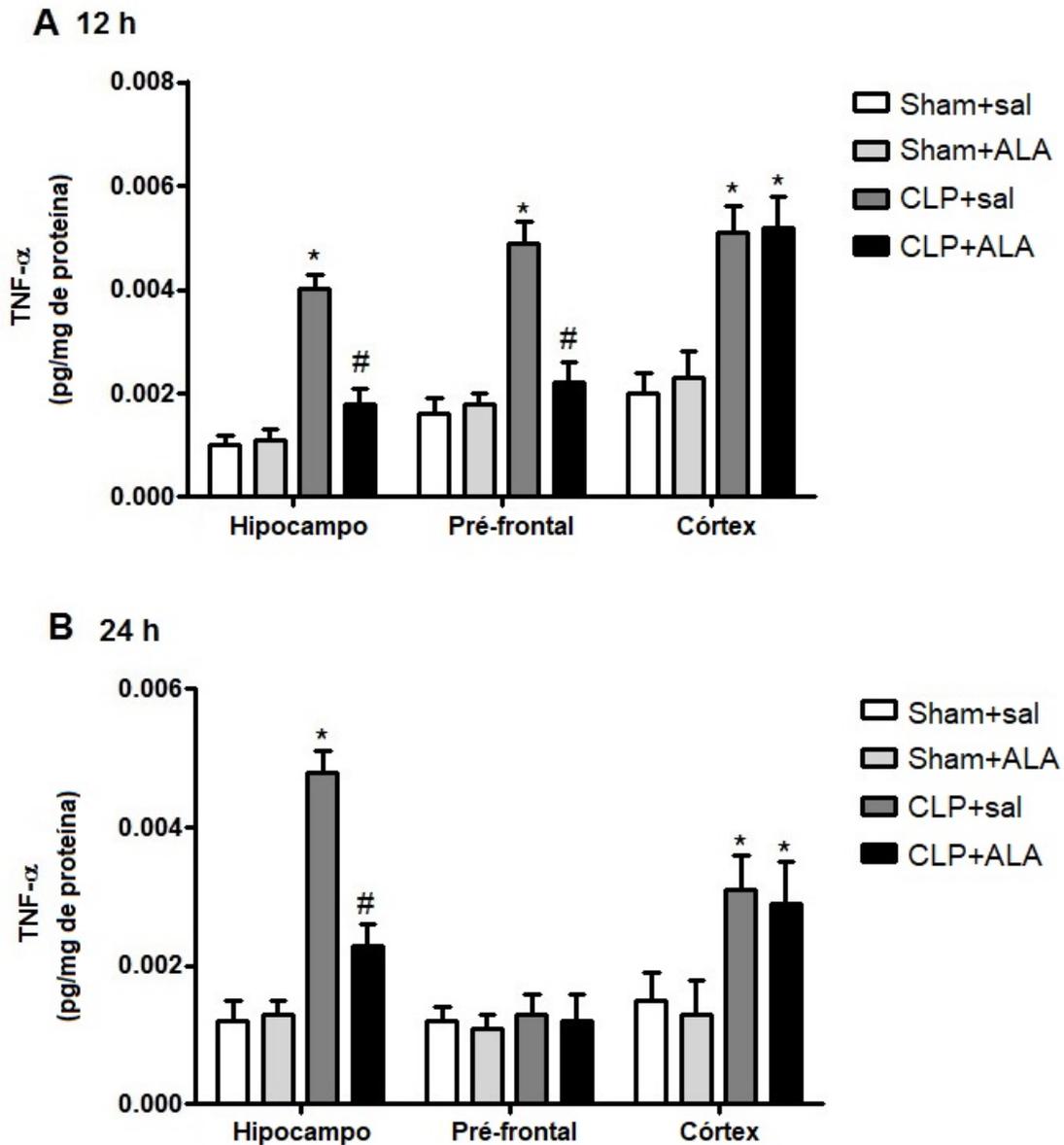
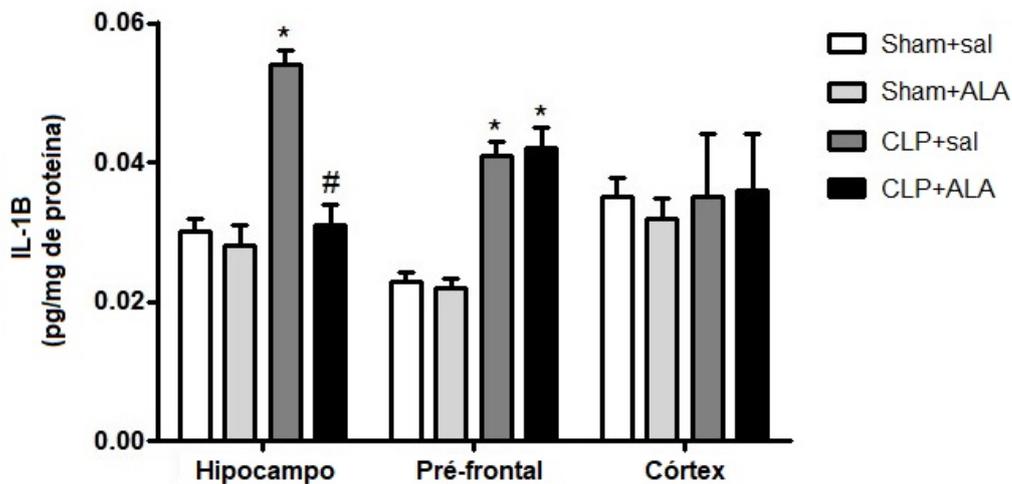


Figura 8 – Concentração de TNF- α em 12 horas (A) e 24 horas (B) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex total de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal.

Em relação à IL-1 β , a sepse (grupo CLP+sal) aumentou as concentrações desta citocina no hipocampo e córtex pré-frontal nos tempos de 12 horas (Fig. 8C) e de 24 horas (Fig. 8D). O tratamento com ALA (grupo CLP+ALA) preveniu significativamente esta alteração apenas no hipocampo em 12 horas, e no hipocampo e córtex pré-frontal em 24 horas após a indução de sepse.

C 12 h



D 24 h

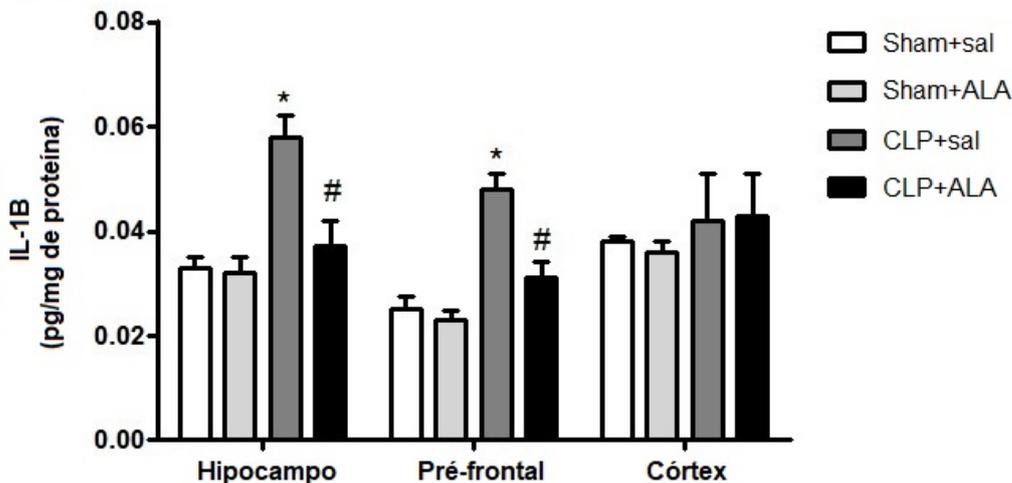


Figura 8 – Concentração IL-1 β em 12 horas (C) e 24 horas (D) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex total de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal.

4.1.1.3. Atividade da mieloperoxidase

A atividade da MPO nas estruturas cerebrais no tempo de 12 horas após a sepse está descrita na Figura 9A. A sepse aumentou a atividade da MPO no hipocampo e no córtex total do grupo CLP+sal, e o tratamento com ALA foi significativamente efetivo em prevenir esta alteração nas duas estruturas do grupo CLP+ALA.

Em 24 horas após a indução de sepse (Fig. 9B), os animais do grupo CLP+sal apresentaram aumento na atividade da MPO no hipocampo e no córtex pré-frontal, e o tratamento com ALA (grupo CLP+ALA) significativamente reduziu esta elevação em ambas as estruturas.

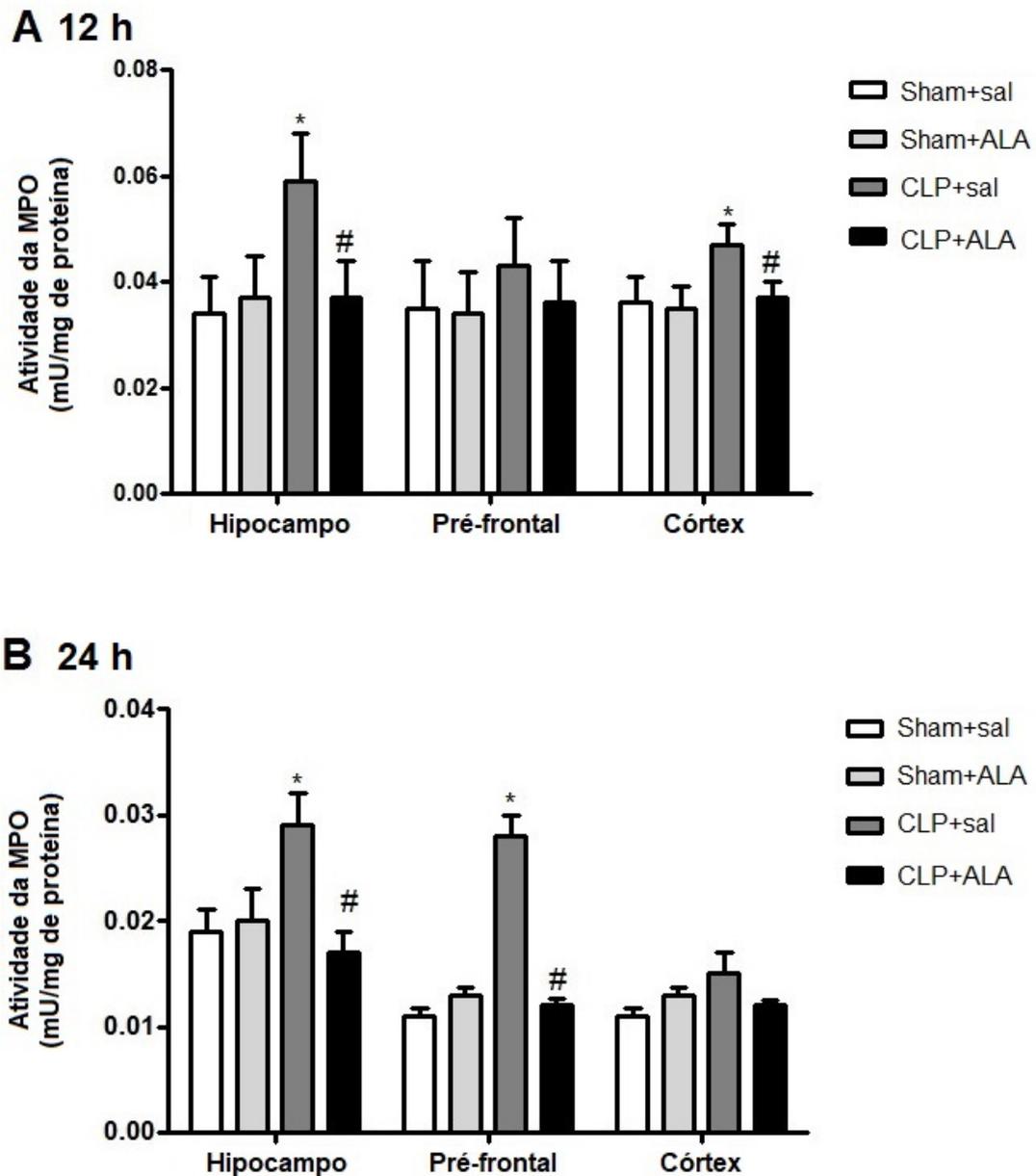


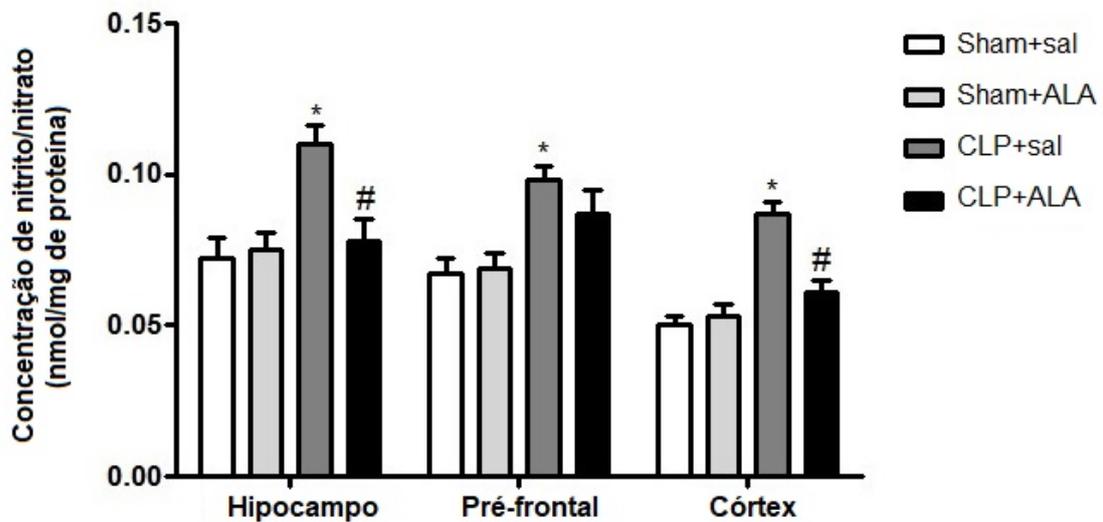
Figura 9 – Atividade da MPO em 12 horas (A) e 24 horas (B) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex total de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal.

4.1.1.4. Concentração de nitrito e nitrato

Em relação as concentrações de nitrito e nitrato, observou-se que a sepse (grupo CLP+sal) causou um aumento significativo deste marcador nas três

estruturas avaliadas nos tempos de 12 horas (Fig. 10A) e de 24 horas após a indução (Fig. 10B). Os animais com sepse e tratados com ALA (grupo CLP+ALA) apresentaram diminuição significativa nas concentrações de nitrito e nitrato no hipocampo e córtex total, em 12 horas, e em todas as estruturas, em 24 horas.

A 12 h



B 24 h

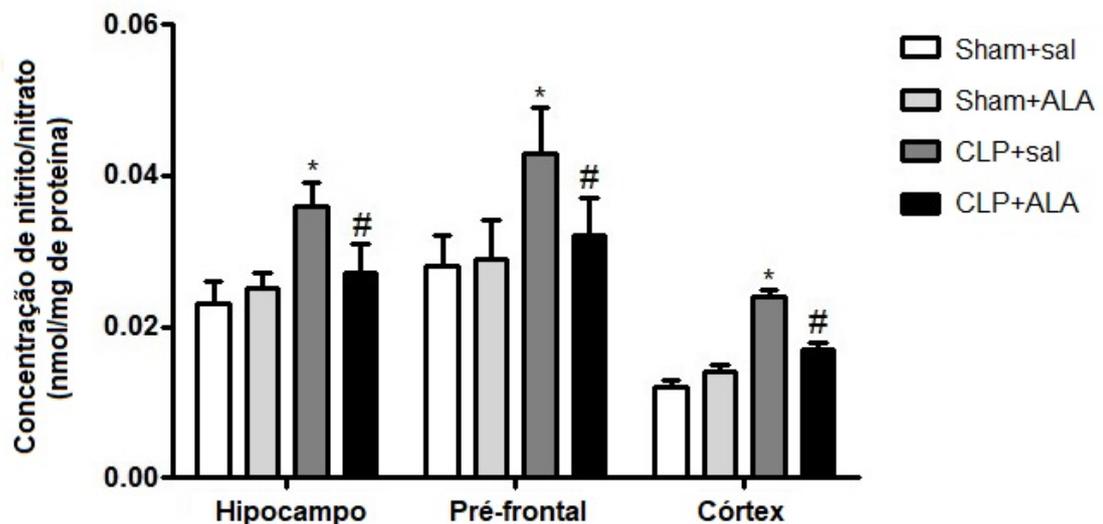


Figura 10 – Concentração de nitrito e nitrato em 12 horas (A) e 24 horas (B) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex total de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal.

4.1.1.5. Dano oxidativo a lipídeo e proteína

Em 12 horas após a indução de sepse, notou-se que os animais do grupo CLP+sal apresentaram aumento na formação de TBARS no córtex total (Fig. 11A), em comparação aos animais controle (grupo Sham+sal), enquanto que no tempo de 24 horas a formação de TBARS apresentou-se elevada em todas as estruturas deste grupo (Fig. 11B). O tratamento com ALA (grupo CLP+ALA) mostrou-se significativamente capaz de prevenir estas alterações nas três estruturas estudadas somente no tempo de 24 horas.

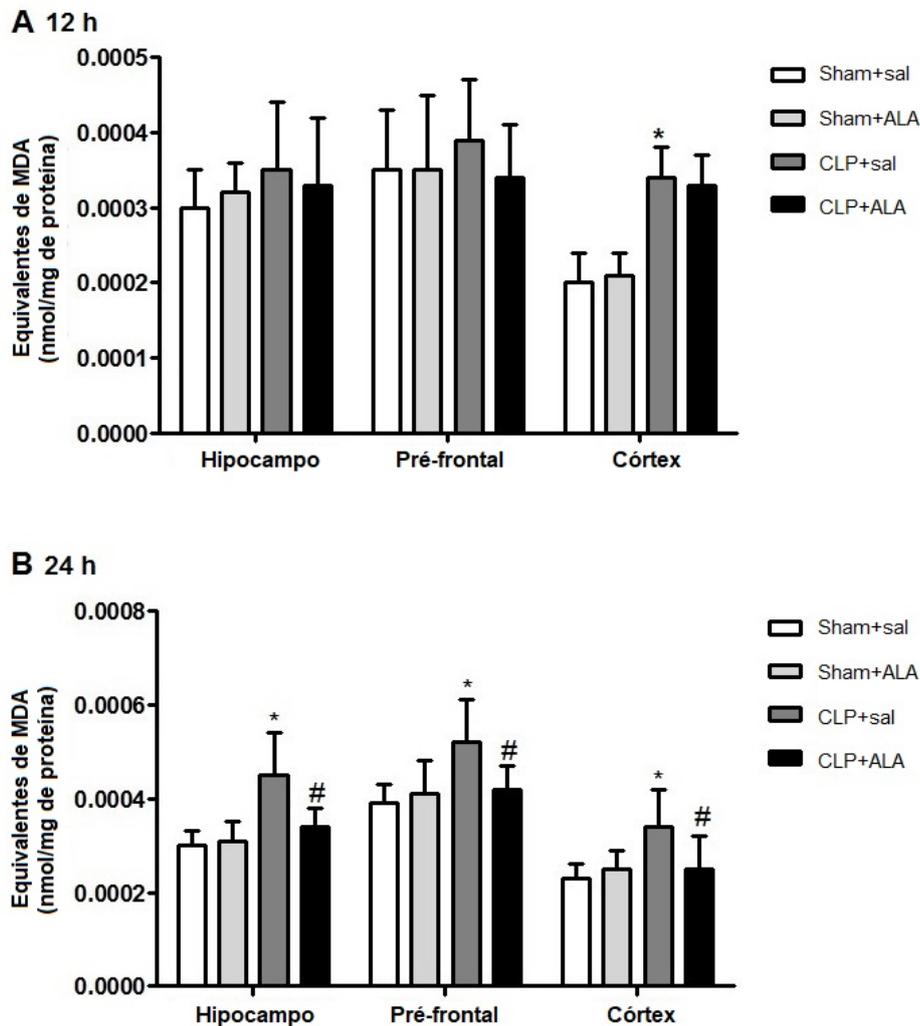


Figura 11 – Concentração de equivalentes de MDA em 12 horas (A) e 24 horas (B) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex total de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal.

Em se tratando da carbonilação proteica, a sepse elevou as concentrações deste marcador no hipocampo e no córtex total dos animais do grupo CLP+sal, em ambos os tempos avaliados (Fig. 12A e 12B, respectivamente). A administração de ALA preveniu significativamente esta alteração nas duas estruturas alteradas, nos tempos de 12 horas e 24 horas após a indução de sepse.

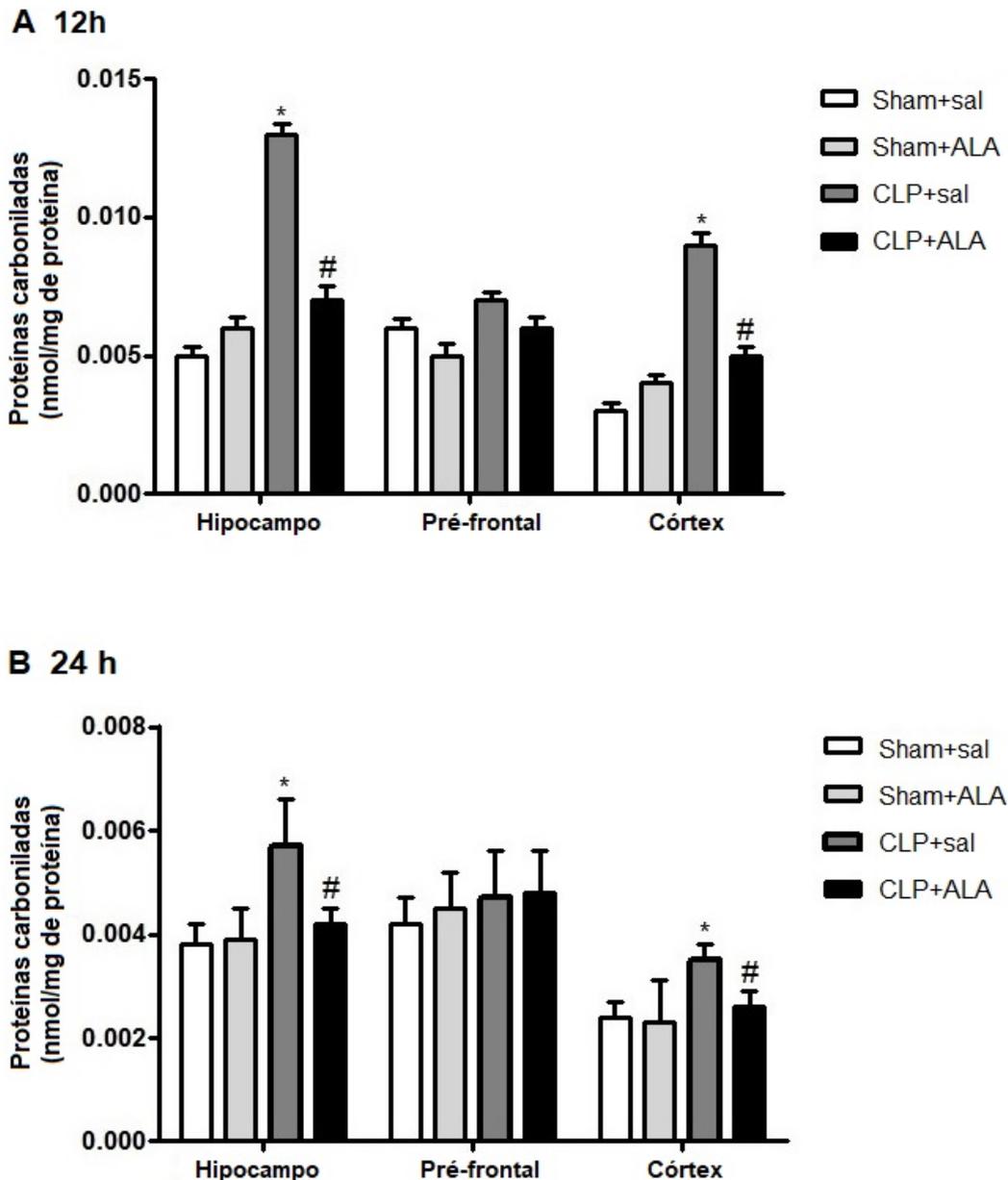


Figura 12 – Concentração de proteínas carboniladas em 12 horas (A) e 24 horas (B) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex total de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal.

4.1.1.6. Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade da enzima antioxidante SOD está representada na Figura 13. Em 12 horas após a indução de sepse (Fig. 13A), a atividade da SOD diminuiu nas três estruturas avaliadas dos animais com sepse (grupo CLP+sal), enquanto que no tempo de 24 horas (Fig. 13B) a mesma se mostrou alterada no hipocampo e no córtex total, comparado ao grupo controle (Sham+sal). O tratamento com ALA não foi efetivo em prevenir a alteração da atividade da SOD após a sepse.

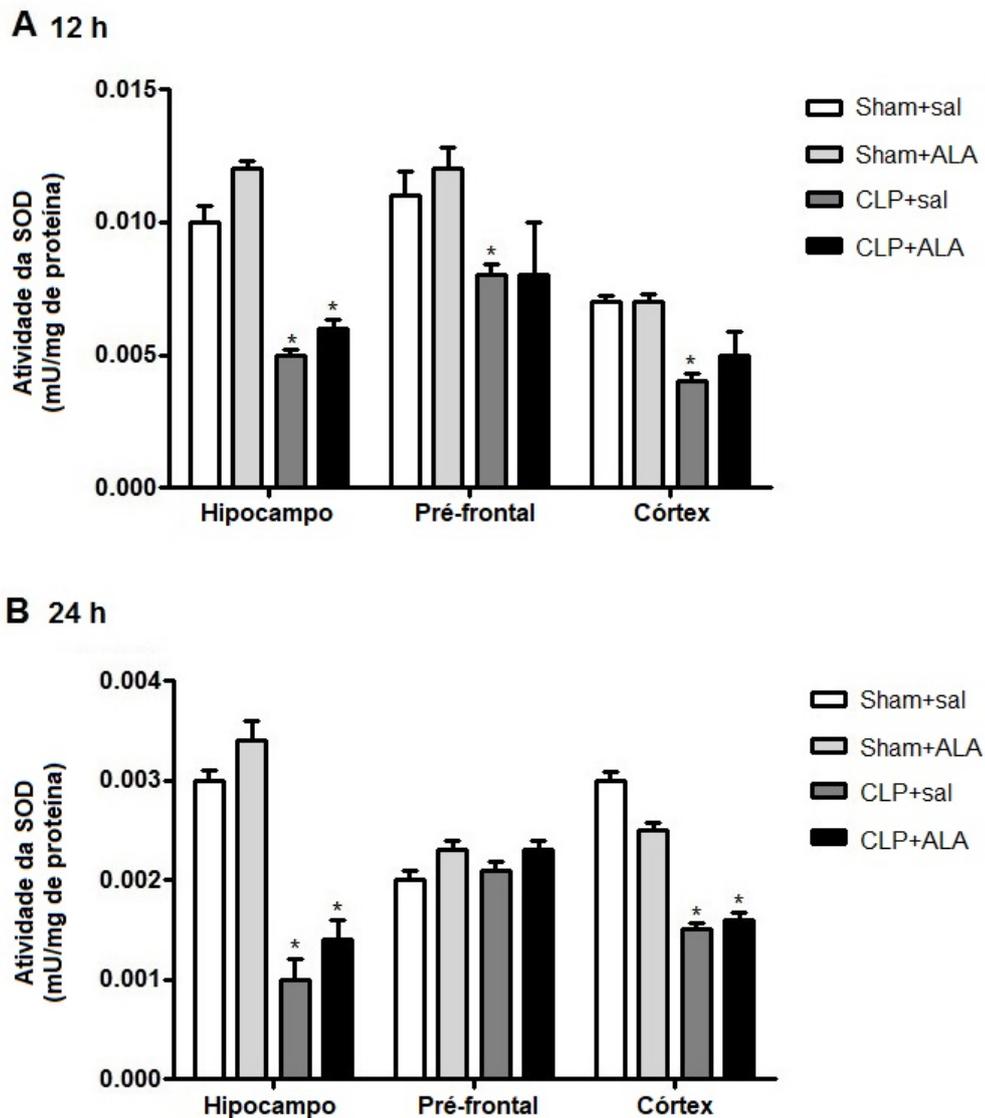


Figura 13 – Atividade da SOD em 12 horas (A) e 24 horas (B) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex total de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal.

A atividade da enzima antioxidante CAT (Fig. 14) apresentou-se diminuída no hipocampo e córtex total dos animais com sepse (grupo CLP+sal) nos dois tempos avaliados. Quando tratados com ALA, os animais do grupo CLP+ALA apresentaram aumento na atividade da CAT no hipocampo e córtex total em ambos os tempos estudados, em comparação ao grupo CLP+sal.

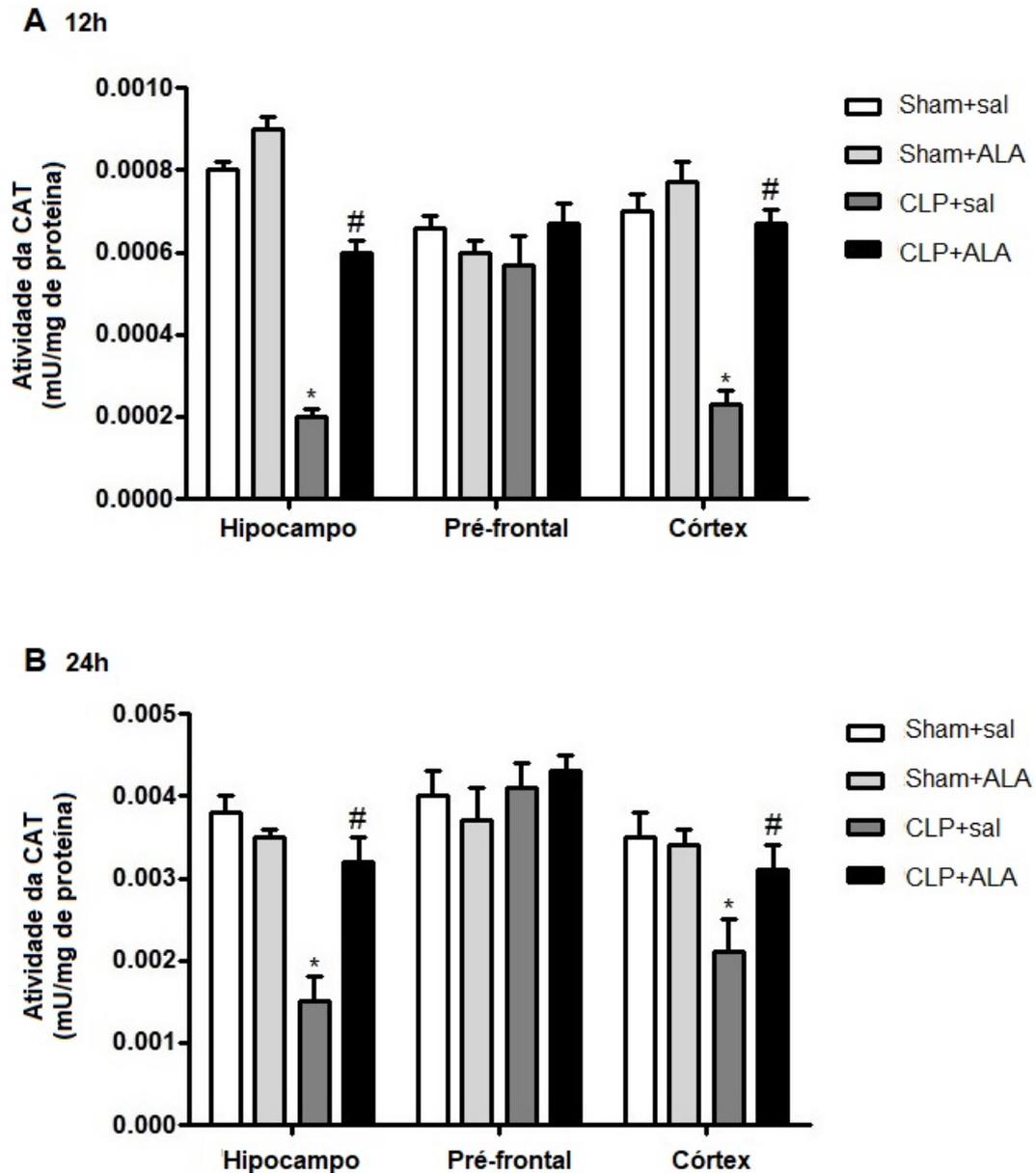


Figura 14 – Atividade da CAT em 12 horas (A) e 24 horas (B) no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex total de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como média \pm desvio-padrão ($n = 5 - 8$) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal.

4.1.2. Determinações em 10 dias

4.1.2.1. Concentração de BDNF

As concentrações de BDNF estão ilustradas na Fig. 15. Observou-se que a sepse (grupo CLP+sal) causou uma redução nas concentrações desta neurotrofina no córtex total, em comparação ao grupo controle (Sham+sal). O tratamento com ALA não preveniu esta alteração e não afetou as concentrações nas outras estruturas avaliadas.

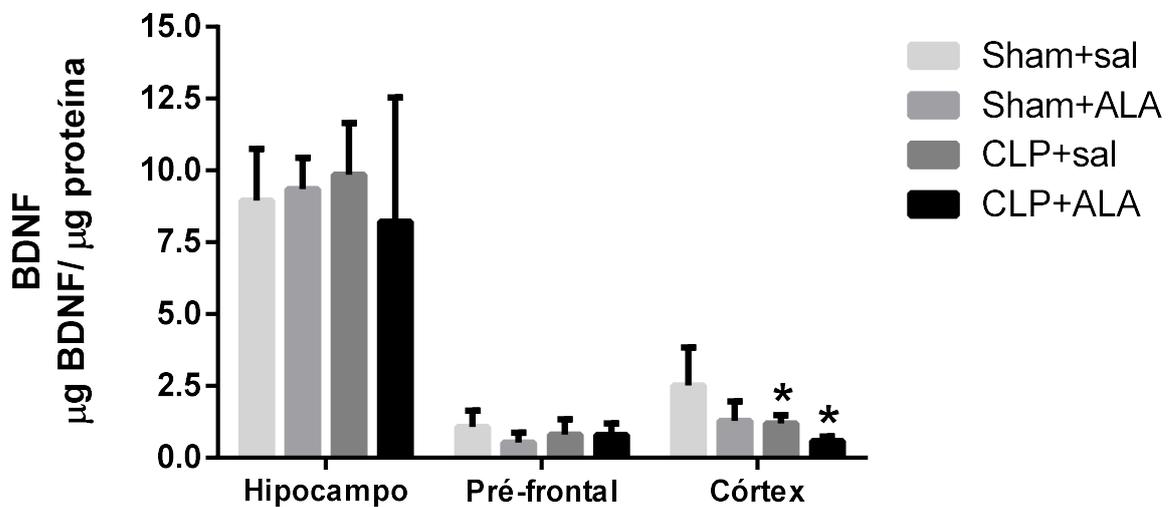


Figura 15 – Concentração de BDNF no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex total de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como média \pm desvio-padrão ($n = 5$) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal.

4.1.2.2. Concentração de NGF

A Figura 16 demonstra as concentrações de NGF nas estruturas avaliadas. Notou-se que a sepse (grupo CLP+sal) reduziu as concentrações desta neurotrofina no córtex total, enquanto que o tratamento com ALA (grupo CLP+ALA) foi efetivo em prevenir esta alteração. Além disso, a administração de ALA elevou significativamente as concentrações hipocampais de NGF, em comparação ao grupo CLP+sal. No córtex pré-frontal o tratamento com ALA não promoveu alterações significativas.

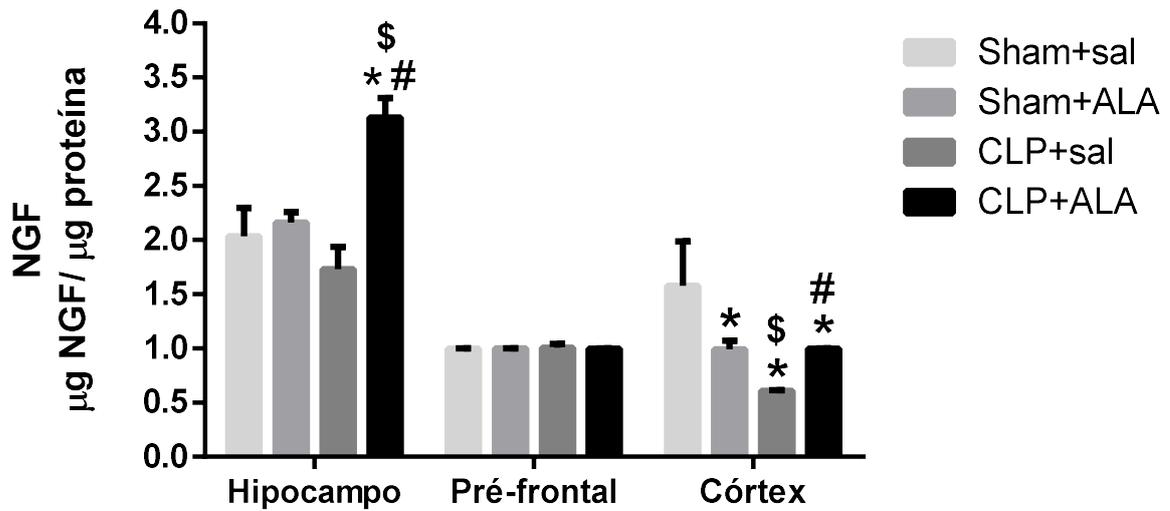


Figura 16 – Concentração de NGF no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex total de ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como média \pm desvio-padrão ($n = 5$) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; \$: comparado ao grupo Sham+ALA; #: comparado ao grupo CLP+sal.

4.1.2.3. Teste de habituação em campo aberto

As Figuras 17 e 18 apresentam os resultados referentes ao número de *crossing* e de *rearing*, respectivamente, obtidos pelo teste de habituação em campo aberto. Os animais com sepse (grupo CLP+sal) não exibiram diferença significativa no número de *crossing* e de *rearing* entre as sessões de treino e de teste, sugerindo prejuízo de memória. Em contrapartida, os animais com sepse e tratados com ALA (grupo CLP+ALA) demonstraram diferença estatisticamente significativa no número de *crossing*, mas não de *rearing*, entre as sessões de treino e de teste.

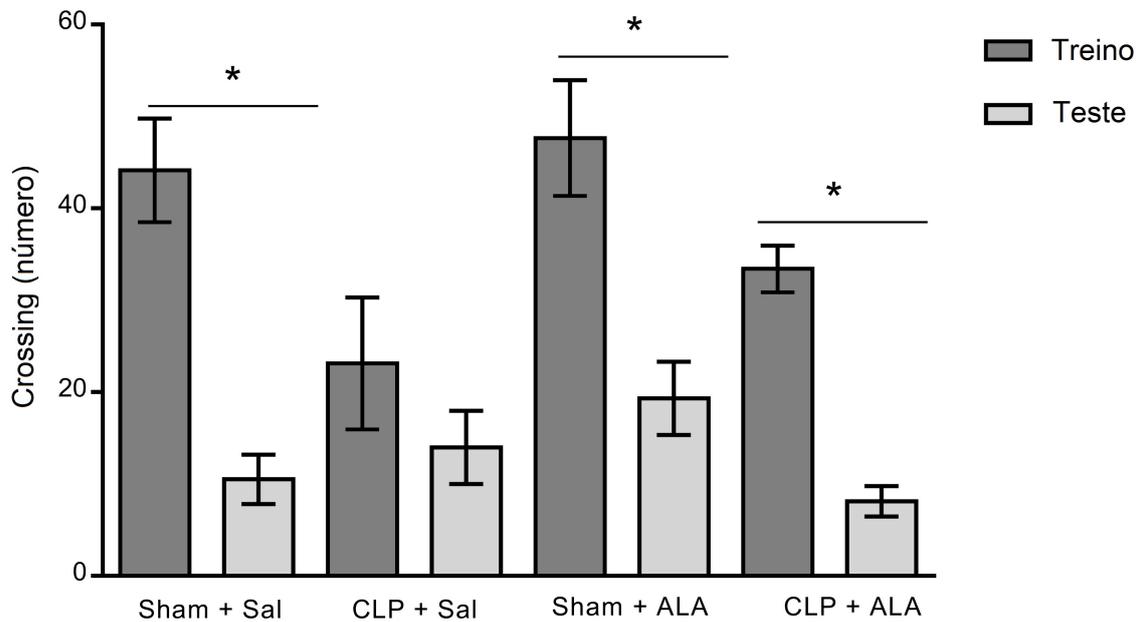


Figura 17 – Número de crossing no teste de habituação ao campo aberto de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 10) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado à sessão de treino.

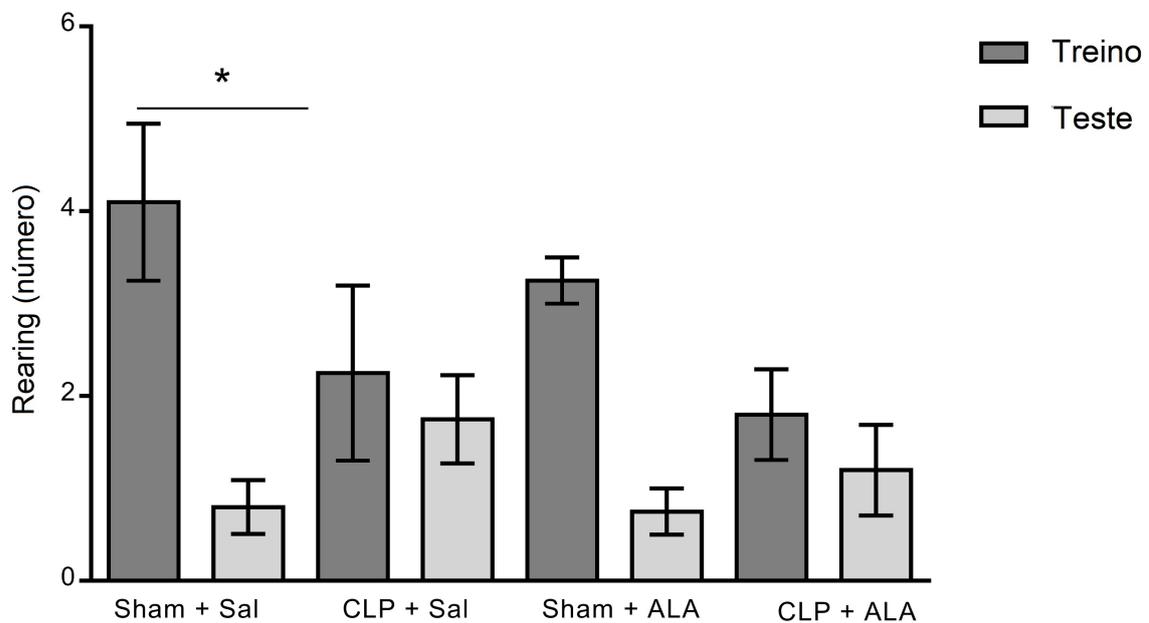


Figura 18 – Número de *rearings* no teste de habituação ao campo aberto de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 10) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado à sessão de treino.

4.1.2.4. Teste de reconhecimento de objetos

A avaliação da memória em curto prazo e em longo prazo, determinada por meio do teste de reconhecimento de objetos, está representada nas Figuras 19 e 20. Denotou-se que os animais com sepse (grupo CLP+sal) apresentaram tempos similares ao explorar os objetos familiares e novos, tanto na avaliação em curto prazo, quando em longo prazo. Por outro lado, os animais com sepse e tratados com ALA (grupo CLP+ALA) dispenderam um maior tempo para explorar o novo objeto na avaliação em curto prazo e em longo prazo.

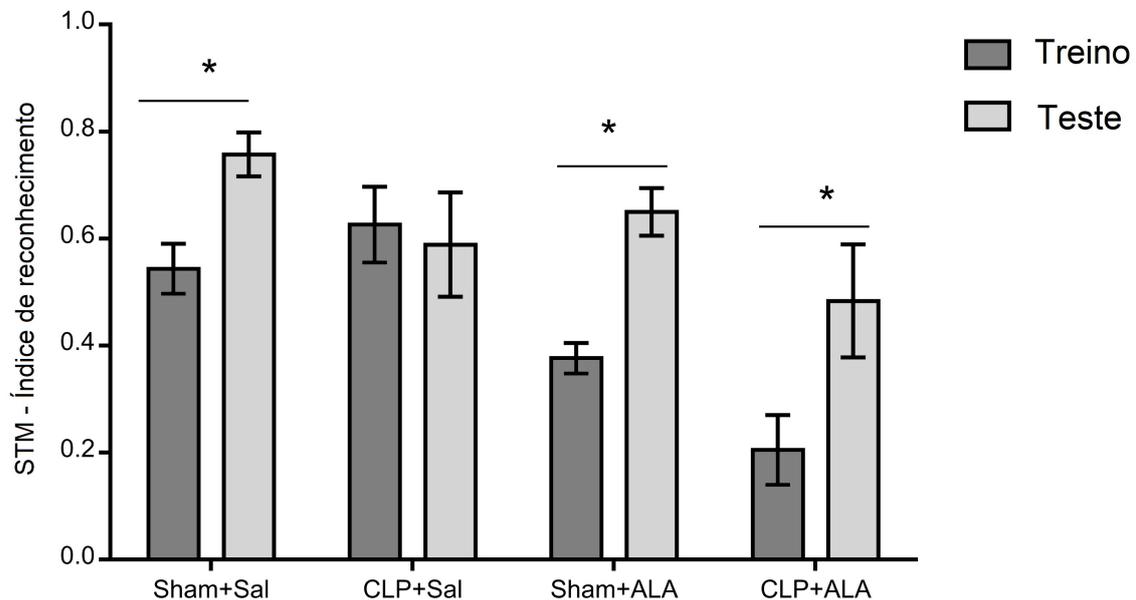


Figura 19 – Índice de reconhecimento de objetos em curta duração (STM) em ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como mediana [intervalo interquartil] (n = 10) analisados pelos testes de Mann Whitney e Wilcoxon. *: comparado à sessão de treino.

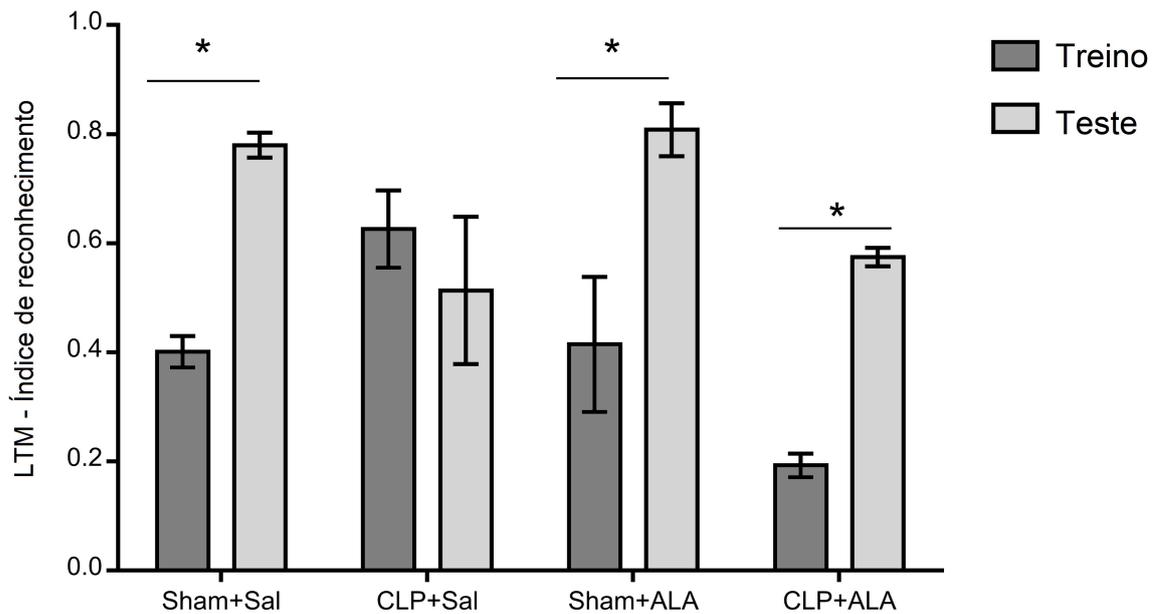


Figura 20 – Índice de reconhecimento de objetos em longa duração (LTM) em ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA). Dados expressos como mediana [intervalo interquartil] (n = 10) analisados pelos testes de Mann Whitney e Wilcoxon. *: comparado à sessão de treino.

4.2. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou o papel neuroprotetor desempenhado pelo ALA em um modelo pré-clínico de sepse. Observou-se que o nutracêutico em teste, ALA, em 24 horas após a indução da sepse, reduziu a alteração na permeabilidade da BHE e a neuroinflamação ao diminuir as concentrações de citocinas, a formação de nitrito/nitrato e a atividade da MPO, ao mesmo tempo em que minimizou o dano oxidativo e elevou a atividade antioxidante nas estruturas cerebrais. Além disso, ALA também elevou as concentrações de NGF e preveniu o dano cognitivo, ambos avaliados em 10 dias após a sepse. Pesquisas anteriores relataram efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do ALA em modelos animais de sepse em órgãos periféricos^{21,192,256}; no entanto, a ausência de avaliações acerca do papel neuroprotetor exercido pelo ALA na disfunção cerebral induzida pela sepse justificou a realização da atual pesquisa.

Embora a BHE seja uma importante barreira contra a entrada de toxinas de bactérias²⁵⁷, a inflamação sistêmica pode levar a alterações no SNC^{14,102} por meio das vias do nervo vago e dos CVO⁵⁴. As concentrações de citocinas circulantes no

plasma elevam-se rapidamente após o insulto endotoxêmico e decaem gradualmente, porém permanecem elevadas no SNC^{258,259}. Inicialmente após a sepse, células endoteliais da BHE ativam-se e perpetuam a resposta inflamatória local ao produzir citocinas inflamatórias capazes de interagir com células próximas²⁶⁰, e isto pode ser comprovado pelo aumento nas concentrações de TNF- α , IL-1 β e nitrito/nitrato no hipocampo, córtex total e pré-frontal em 12 horas após CLP.

Corroborando com achados anteriores^{73,261}, os resultados da atual pesquisa comprovam que a inflamação sistêmica e o estresse oxidativo são cruciais em mediar a integridade da BHE 24 horas após a indução de sepse. A administração de ALA mostrou-se efetiva em reduzir a produção de citocinas no hipocampo e córtex pré-frontal em 12 e 24 horas, bem como a permeabilidade da BHE no hipocampo em 24 horas. Tais alterações positivas devem-se, especialmente, à capacidade do ALA em eliminar radicais livres intracelulares e regular os processos de sinalização inflamatórios sensíveis ao estado redox, como a translocação de NF- κ B (fator nuclear- κ B)^{262,263}. Além disso, devido ao seu reduzido peso molecular e elevada solubilidade em água e lipídeos, ALA pode facilmente atravessar a BHE²⁶⁴, o que sustenta diversos estudos que comprovam os efeitos benéficos do ALA no tratamento de processos neuroinflamatórios²⁶⁴⁻²⁶⁶.

Sabe-se que o infiltrado inflamatório é composto por neutrófilos ativados, os quais estimulam a síntese de mediadores inflamatórios capazes de induzir a geração de espécies reativas derivadas de nitrogênio no tecido encefálico^{12,267}. Neste sentido, a produção de NO pode ser considerada um estímulo citotóxico quando ultrapassa níveis críticos, o que é frequentemente observado na sepse. Esta citotoxicidade decorre da reação entre o NO e o ânion superóxido, tendo como produto o peroxinitrito, além do próprio dano celular devido à interação com proteínas, metais e compostos ricos em ferro, enxofre ou heme²⁶⁸. Além disso, a formação de peroxinitrito é considerada um evento terminal diretamente relacionado à morte celular e dano tecidual na sepse²⁶⁹⁻²⁷¹, especialmente no SNC²⁷².

Em cultura celular de macrófagos RAW 264.7 o tratamento com ALA exibiu efeito anti-inflamatório ao inibir a produção de NO²⁷³. ALA também inibiu a ativação da enzima iNOS em macrófagos estimulados com LPS²⁷⁴ e reduziu a resposta inflamatória aguda causada pelo LPS²⁷⁵. Em células do SNC, o ALA também se mostrou efetivo em suprimir a expressão de iNOS em micróglias BV-2 estimuladas

com LPS²⁷⁶. Os achados da pesquisa atual demonstram que o tratamento com ALA reduziu o infiltrado de neutrófilos e a formação de nitrito/nitrato no SNC de ratos com sepse polimicrobial em 12 e 24 horas após a indução.

Os principais mecanismos de ação desempenhados pelo ALA relacionam-se à diminuição do estresse oxidativo. ALA é capaz de quelar metais e inibir, por consequência, a formação de radicais hidroxil; também pode eliminar ERO e, assim, favorecer o aumento nas concentrações de glutathiona reduzida e de enzimas antioxidantes¹⁸⁵. Na sepse, a ocorrência de estresse oxidativo está associada com a ocorrência de disfunção de múltiplos órgãos¹⁵⁵, e no SNC de modelos animais é possível visualizar dano oxidativo já na fase inicial da sepse¹⁵⁶. No presente estudo a administração de ALA reduziu a peroxidação lipídica nas estruturas cerebrais em 24 horas após a indução de sepse, corroborando com estudos que apontam o papel do ALA em eliminar produtos altamente reativos derivados da peroxidação lipídica^{185,277}. Além disso, ALA também previne o dano oxidativo a proteínas por meio da eliminação de hipoclorito^{278,279}, o que está de acordo com os resultados observados na presente pesquisa, tendo em vista que o tratamento com ALA diminuiu significativamente as concentrações de proteínas carboniladas no hipocampo e córtex total dos animais com sepse.

Além dos mecanismos de ação citados anteriormente, ALA também atua como um composto de ação antioxidante propriamente dito, conforme evidenciado em estudos anteriores^{280,281}. Devido a isso, ALA pode aumentar a expressão de genes que decodificam a enzima catalase²⁸² e agir como um agente neuroprotetor em diversas doenças neurodegenerativas relacionadas ao estresse oxidativo, considerando o aumento na atividade da CAT no hipocampo e córtex total após a indução de sepse²⁸³⁻²⁸⁵.

Observou-se que o tratamento com ALA não aumentou significativamente a atividade da SOD. Embora o ALA possa exercer efeitos positivos na eliminação de peróxido de hidrogênio²⁸⁶⁻²⁸⁸, ALA não atua diretamente nesta espécie reativa; tendo em vista que o ALA é utilizado para regenerar outros compostos e enzimas antioxidantes, a sua ação sobre o peróxido de hidrogênio é indireta. Além disso, sabe-se que a atividade da SOD é influenciada pelo NO e este reage com o ânion superóxido para gerar peroxinitrito, o qual participa da nitração de resíduos de tirosina em enzimas como a SOD, reduzindo as suas atividades^{289,290}. Durante a sepse há uma produção massiva de NO, determinada pela formação de

nitrito/nitrato. Na pesquisa atual notou-se que as concentrações de nitrito/nitrato estavam elevadas nos animais com sepse, enquanto que o tratamento com ALA reduziu este marcador. Sendo assim, especulou-se que a atividade da SOD foi influenciada pela formação excessiva de NO.

Evidências científicas apontam que os animais submetidos ao modelo de sepse por CLP apresentam alterações cognitivas em 10 dias após a indução, apesar de estarem completamente recuperados dos processos infeccioso e cirúrgico, e estas alterações podem persistir por até 30 dias^{3,291-293}. Neste estudo avaliou-se o dano cognitivo em longo prazo, 10 dias após a indução de sepse. Utilizou-se o teste de habituação em campo aberto, o qual avalia performance motora na sessão de treino e a memória não-associativa na sessão teste, e o teste de reconhecimento de objetos, o qual avalia memória não-aversiva e não-espacial. Os resultados encontrados indicaram que os animais com sepse apresentaram dano à memória e aprendizado, tendo em vista que os animais continuaram a explorar o aparato do campo aberto mesmo já estando habituados ao mesmo. Ademais, os animais com sepse dispenderam tempos similares para explorar os objetos familiares e novos, tanto 1,5 horas, quanto 24 horas após a sessão treino. Os animais tratados com ALA, pelo contrário, apresentaram comportamento consistente com uma função cognitiva sem comprometimento, e estes achados corroboram com evidências prévias em relação ao uso de compostos com função antioxidante direta ou indireta, como guanosina²⁹⁴, cannabidiol²⁹⁵ e o uso associado de n-acetilcisteína e deferoxamina¹¹⁷.

As neurotrofinas exercem papel fundamental na função cognitiva, atuando em inúmeras vias moleculares relacionadas com a neurogênese, cognição, memória e aprendizado²⁹⁶. O NGF, por exemplo, influencia a sobrevivência, crescimento e manutenção de certos tipos de neurônios do SNC e sistema nervoso periférico (SNP). No encéfalo, o NGF é sintetizado no córtex e no hipocampo, onde também pode ser produzido o BDNF²⁹⁷. O BDNF é o principal fator de crescimento no SNC, impactando o crescimento neuronal, a morfologia e a plasticidade sináptica²⁹⁸. Estas neurotrofinas interagem com a família do receptor de tropomiosina quinase (Trk), sendo o NGF um ligante para o tipo A (TrkA) e o BDNF um ligante para o tipo B (TrkB)²⁹⁹. A ligação ao receptor ativa a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), levando à liberação de neurotrofina dependente da proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB)³⁰⁰. O CREB é um fator de transcrição que se conecta à

região promotora de genes associados à plasticidade neuronal e remodelamento de sinapses³⁰¹, sendo parcialmente responsável pelo papel inibitório das neurotrofinas no mecanismo de morte celular³⁰².

Estudos sugerem que o estresse oxidativo e seus produtos derivados podem influenciar negativamente a atividade ligante do CREB ao DNA, o que culminaria em redução na expressão de neurotrofinas^{303–305}. Em contrapartida, as terapias antioxidantes podem influenciar vias intracelulares que levam à síntese e ação das neurotrofinas. Em um modelo de doença de Alzheimer, por exemplo, o uso de extrato da casca de romã aumentou as concentrações de BDNF e preservou a memória espacial em camundongos, devido ao seu elevado conteúdo de compostos fitoquímicos com ação antioxidante³⁰⁶. Outro fitoquímico com ação antioxidante capaz de ativar a produção de neurotrofinas e exercer neuroproteção é o resveratrol³⁰⁰. Resultados semelhantes foram visualizados em ratos com meningite pneumocócica tratados com ácido fólico, os quais apresentaram aumento nas concentrações de BDNF e melhora na função cognitiva em 10 dias após a indução da doença³⁰⁷.

As alterações nas concentrações de neurotrofinas podem ser detectadas em 10 dias após a indução de sepse⁹⁴, embora elas possam perdurar por até 30 dias devido à resposta inflamatória e o dano oxidativo visualizados na fase aguda e inicial da sepse¹³. O estudo atual demonstrou que o tratamento com ALA elevou significativamente as concentrações de NGF no hipocampo e no córtex total dos ratos com sepse, 10 dias após a indução. Ainda, observou-se que a administração de ALA resultou na diminuição da oxidação lipídica e proteica em 24 horas após a indução de sepse. Desta maneira, acredita-se que ALA influenciou as concentrações de NGF, ao menos parcialmente, ao prevenir o estresse oxidativo e favorecer a atividade ligante de CREB.

Ao passo que o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica influenciam negativamente a atividade de CREB, as ERO em quantidades limitadas e controladas são mediadores vitais para a sinalização de NGF³⁰⁸. Ainda, a relação entre NGF e CREB depende de ERO, e esta pode ser prejudicada por tratamentos antioxidantes³⁰⁹. Neste contexto, o tratamento com ALA reduziu significativamente as concentrações de NGF no córtex total de ratos do grupo sham+ALA. Os resultados desta pesquisa demonstram que a cirurgia em grupos sham não estimula respostas inflamatória e oxidativa significativas, tendo em vista que os animais

sham, independentemente dos tratamentos usados, exibiram resultados semelhantes na maioria das análises realizadas, exceto nas concentrações de NGF. Isto indica que o tratamento com ALA pode prejudicar o maquinário celular dependente de EROs em um cenário em que os processos inflamatórios e oxidativos não se encontram desequilibrados, impactando as concentrações de NGF.

CAPÍTULO 5: ADMINISTRAÇÃO ISOLADA DE ÓLEO DE PEIXE

5.1. RESULTADOS

5.1.1. Determinações em 24 horas

5.1.1.1. Permeabilidade da barreira hematoencefálica

A alteração na permeabilidade da barreira hematoencefálica está descrita na Fig. 21. Notou-se que a sepse aumentou significativamente a permeabilidade nas três estruturas avaliadas, em comparação ao grupo controle (Sham+sal). Também foi possível notar que o tratamento com OP preveniu de maneira significativa esta alteração no córtex pré-frontal e no córtex total dos animais do grupo CLP+OP.

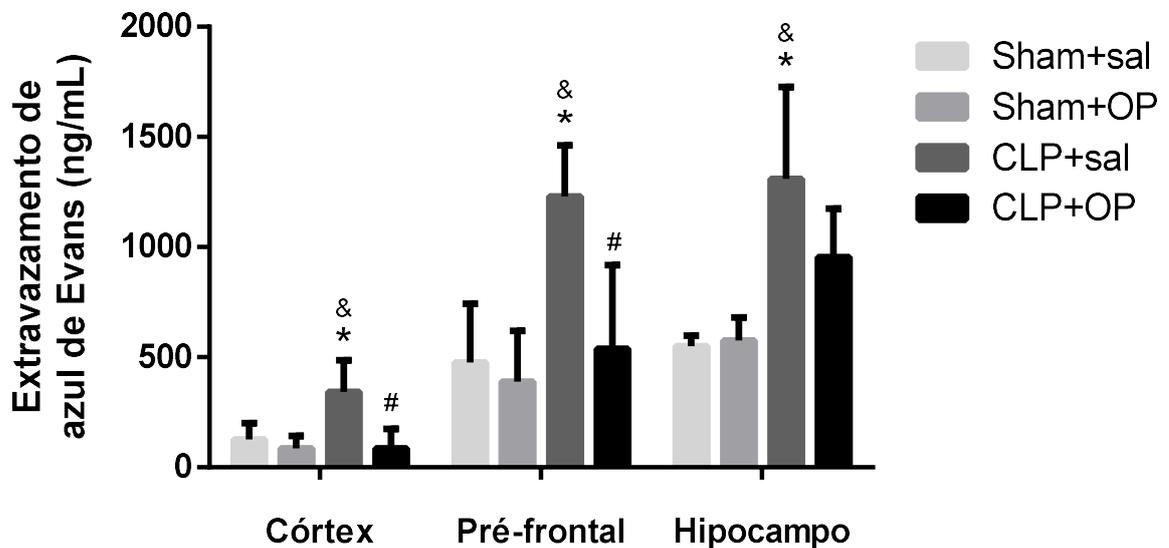


Figura 21 – Permeabilidade da barreira hematoencefálica no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; &: comparado ao grupo Sham+OP; #: comparado ao grupo CLP+sal.

5.1.1.2. Concentração de citocinas

As concentrações das citocinas IL-1 β e IL-10 estão respectivamente descritas nas Figuras 22 e 23. Os animais com sepse (grupo CLP+sal) apresentaram concentrações elevadas de IL-1 β no hipocampo e córtex total, em comparação aos animais controle (grupo Sham+sal); já os animais tratados com OP apresentaram concentrações significativamente diminuídas em todas as estruturas, em comparação ao grupo CLP+sal.

Em relação à IL-10, as concentrações se mostraram elevadas no hipocampo e córtex total dos animais com sepse (grupo CLP+sal), em comparação aos animais controle (grupo Sham+sal). A administração de OP preveniu esta alteração no hipocampo dos animais com sepse (grupo CLP+OP).

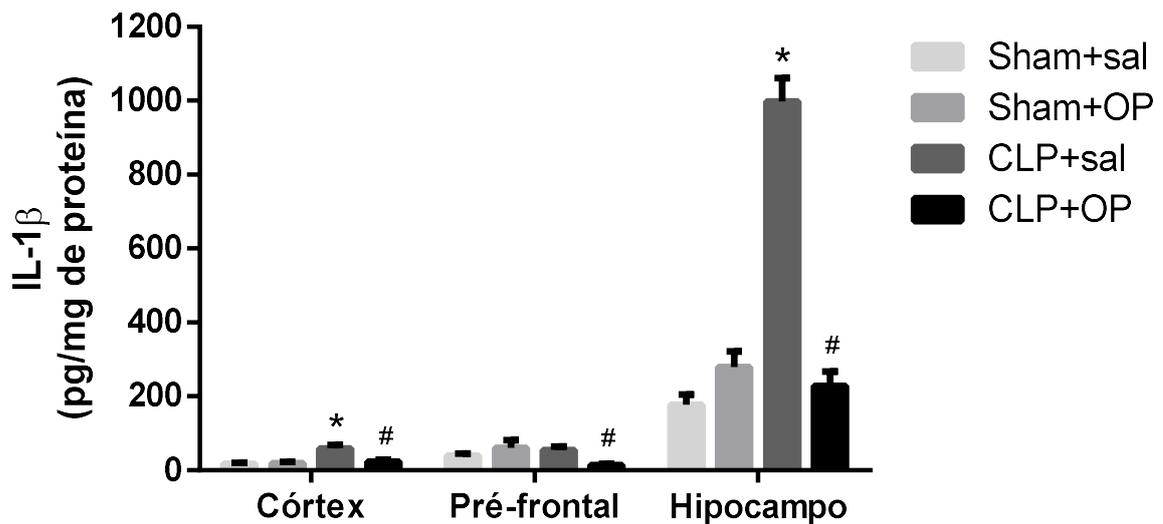


Figura 22 – Concentração de IL-1 β no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como média \pm erro-padrão (n = 5) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal.

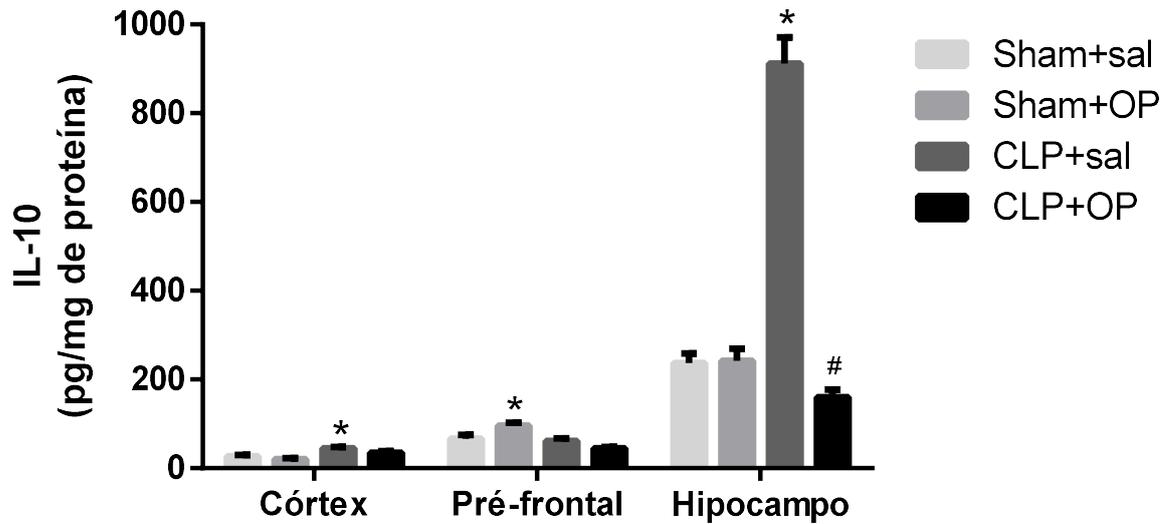


Figura 23 – Concentração de IL-10 no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como média \pm erro-padrão (n = 5) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal.

5.1.1.3. Atividade da mieloperoxidase

A Fig. 24 apresenta os resultados da atividade da MPO, como um indicativo para a infiltração de neutrófilos, nas estruturas cerebrais avaliadas. Observou-se um aumento significativo na atividade da MPO no córtex pré-frontal e no córtex total dos animais do grupo CLP+sal, em comparação aos animais controles (grupo Sham+sal). O tratamento com OP foi efetivo em diminuir a atividade da MPO no córtex pré-frontal e no hipocampo dos animais com sepse (grupo CLP+OP).

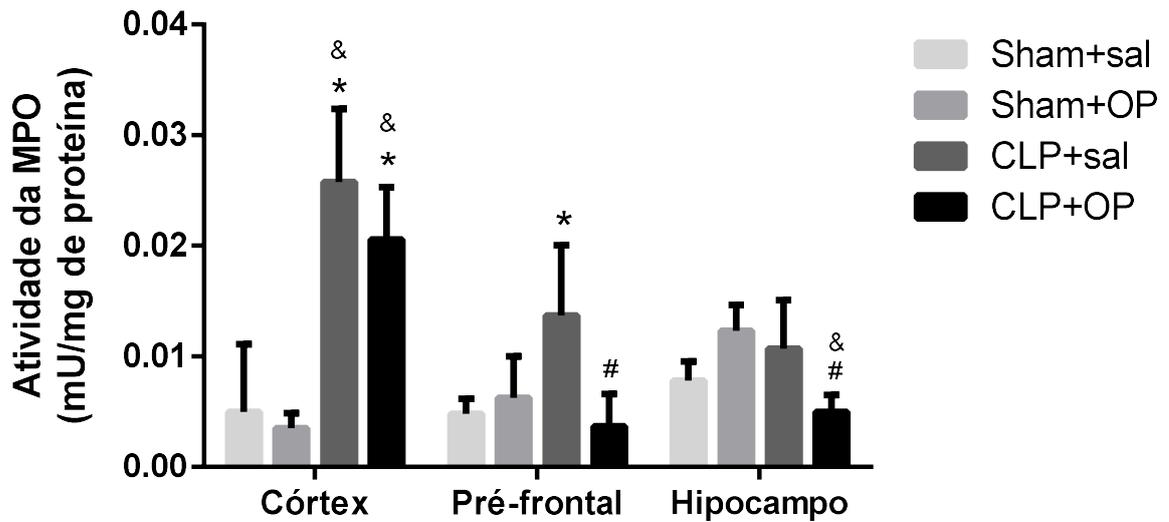


Figura 24 – Atividade da MPO no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal.

5.1.1.4. Concentração de nitrito e nitrato

As concentrações de nitrito e nitrato, demonstradas na Fig. 25, elevaram-se significativamente apenas no hipocampo de ratos submetidos à sepse (grupo CLP+sal), em comparação ao grupo controle (Sham+sal). O tratamento com OP não preveniu esta alteração nos animais com sepse (grupo CLP+OP).

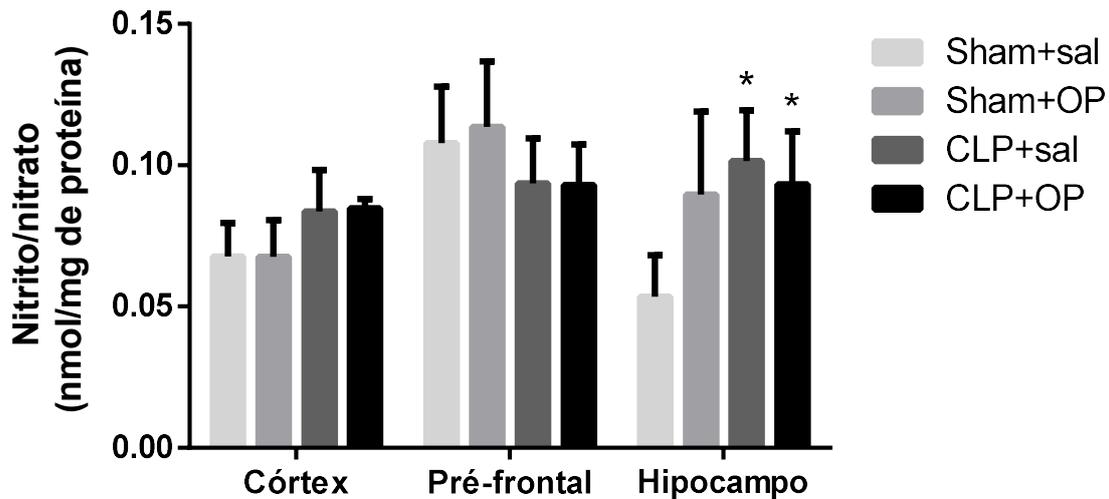


Figura 25 – Concentração de nitrito/nitrato no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal.

5.1.1.5. Dano oxidativo a lipídeo e proteína

A determinação de dano oxidativo à lipídeo e proteína está descrita nas Figuras 26 e 27, respectivamente. A indução de sepse não causou aumento significativo na formação de TBARS, representado por equivalentes de MDA, em nenhuma das estruturas avaliadas.

A carbonilação proteica, em contrapartida, aumentou significativamente nas três estruturas dos animais do grupo CLP+sal, em comparação ao grupo controle (Sham+sal), enquanto que o tratamento com OP preveniu significativamente estas alterações nas estruturas do grupo CLP+OP.

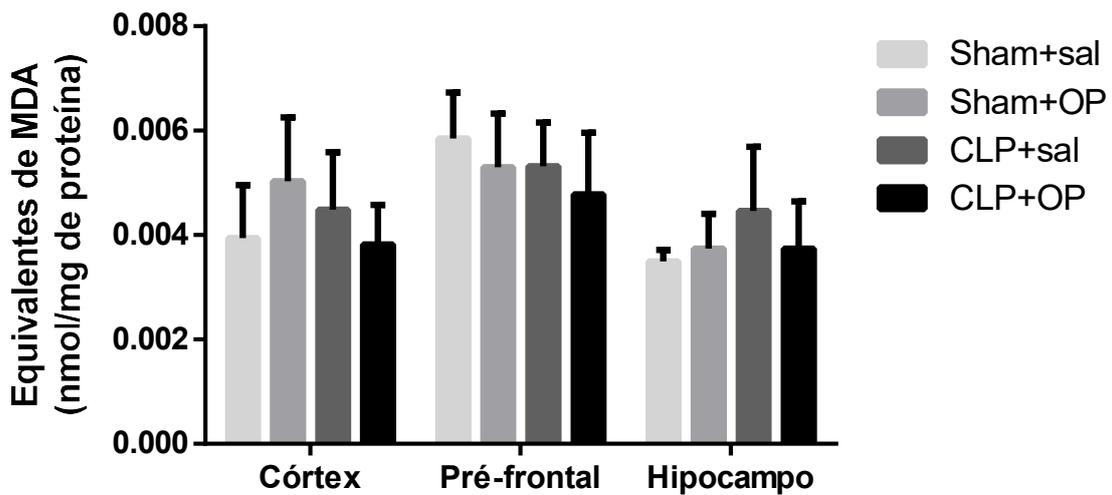


Figura 26 – Concentração de equivalentes de MDA no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

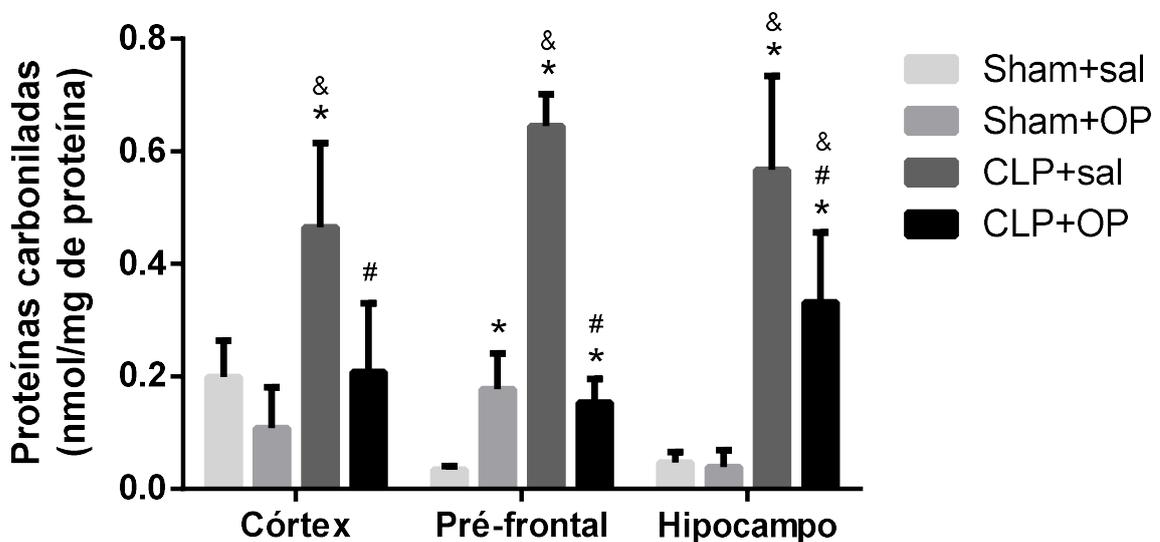


Figura 27 – Concentração de proteínas carboniladas no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; &: comparado ao grupo Sham+OP; #: comparado ao grupo CLP+sal.

5.1.1.6. Atividade de enzimas antioxidantes

Em relação à atividade da enzima antioxidante SOD (Fig. 28), observou-se o tratamento com OP aumentou significativamente a atividade hipocampal desta enzima em ratos com sepse (grupo CLP+OP), em comparação ao grupo controle (Sham+sal). Não houve diferença estatisticamente significativa nas demais estruturas avaliadas.

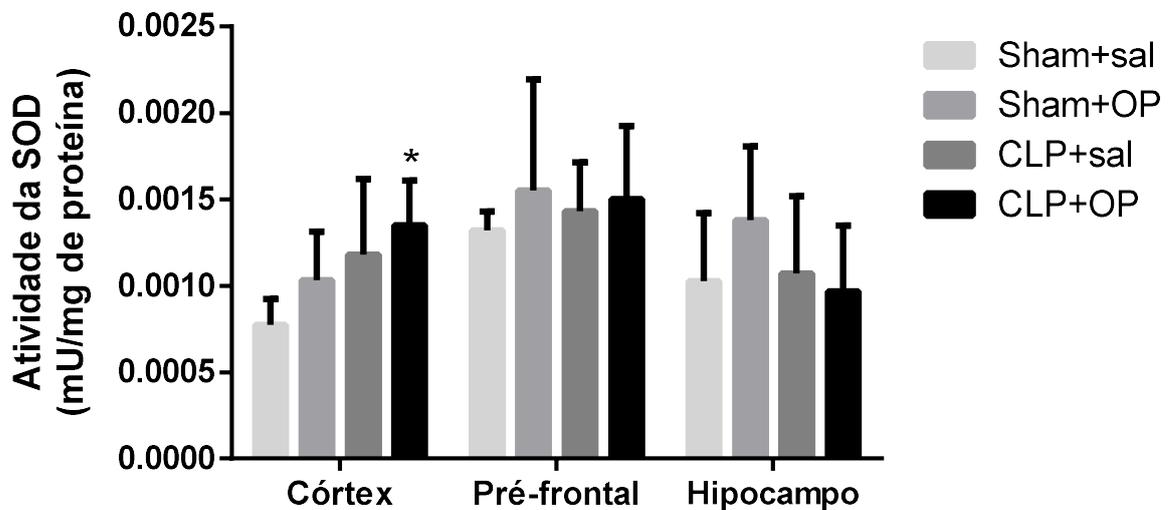


Figura 28 – Atividade da SOD no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como média \pm desvio-padrão ($n = 5 - 8$) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal.

A atividade da enzima antioxidante CAT está ilustrada na Fig. 29. Foi possível notar que a sepse reduziu discretamente a atividade da CAT, porém sem significância estatística. É importante ressaltar que os animais do grupo Sham+OP apresentaram aumento significativo na atividade da enzima em todas as estruturas avaliadas.

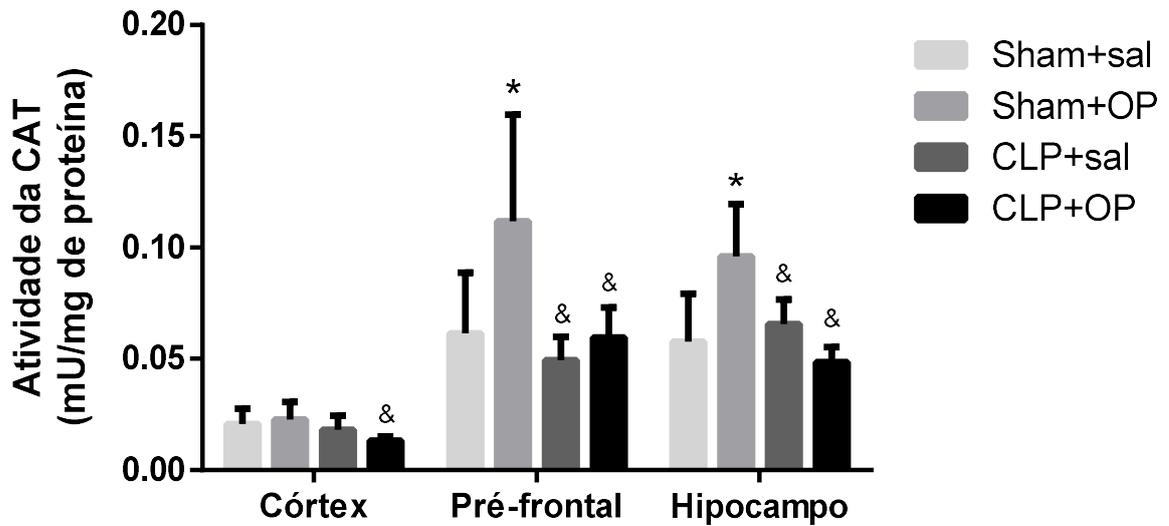


Figura 29 – Atividade da CAT no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; &: comparado ao grupo Sham+OP.

5.1.2. Determinações em 10 dias

5.1.2.1. Concentração de BDNF

As concentrações de BDNF nas estruturas cerebrais estão demonstradas na Fig. 30. Detectou-se que os ratos submetidos à sepse (grupo CLP+sal) apresentaram redução nas concentrações de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo, comparados aos ratos controle (grupo Sham+sal), e estas alterações foram significativamente prevenidas pelo tratamento com OP. Além disso, a administração de OP elevou as concentrações de BDNF no córtex total do grupo Sham+OP, e isto foi significativo em comparação aos demais grupos.

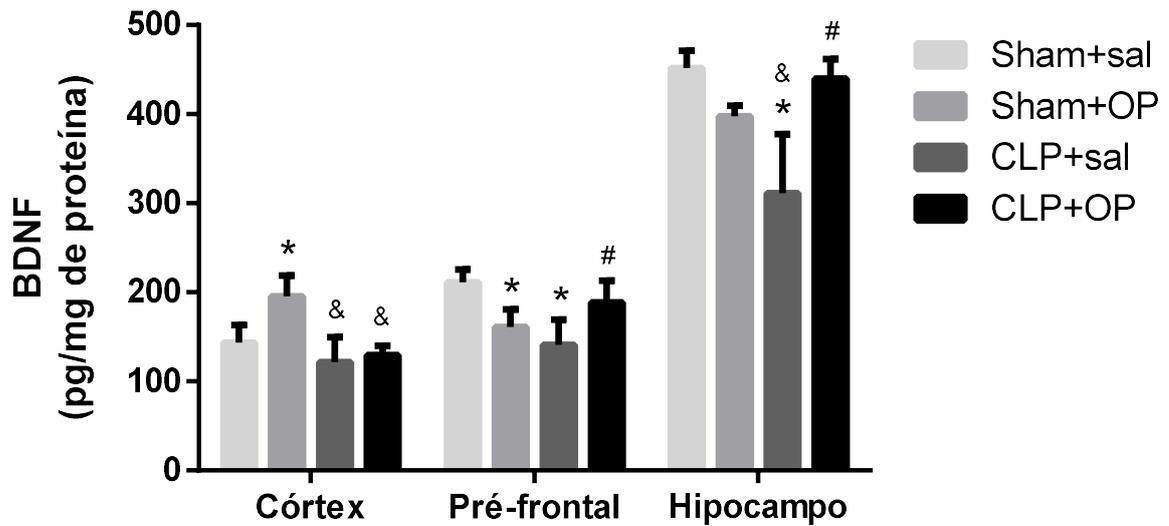


Figura 30 – Concentração de BDNF no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como média \pm desvio-padrão ($n = 5$) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; &: comparado ao grupo Sham+OP; #: comparado ao grupo CLP+sal.

5.1.2.2. Teste de habituação em campo aberto

O comportamento dos animais no teste de habituação em campo aberto está representado nas Figuras 31 e 32. Observou-se que o grupo CLP+sal não apresentou diferença estatisticamente significativa no número de *crossings* (Fig. 31) entre as sessões de treino e de teste. No entanto, os animais do grupo CLP+OP apresentaram uma redução significativa no número de *crossings* na sessão de teste, comparada à sessão de treino.

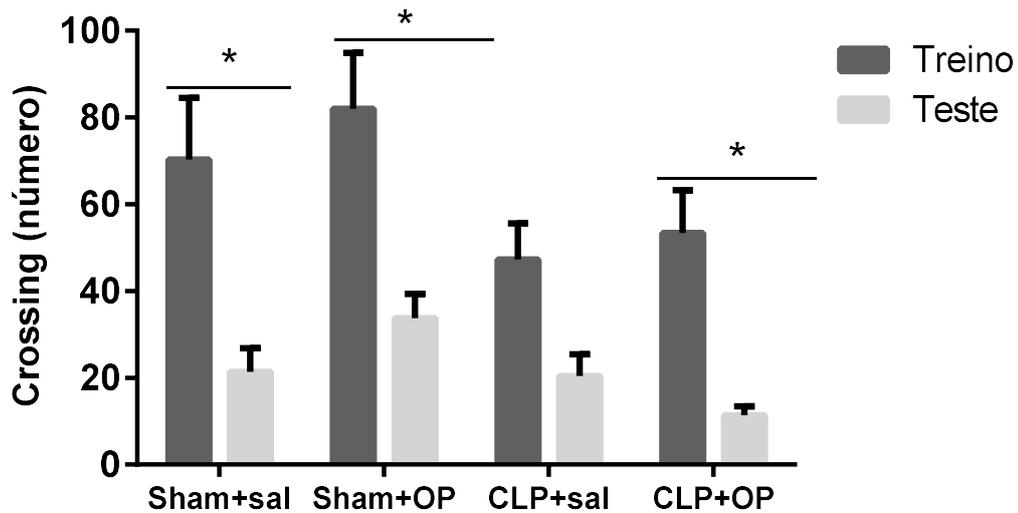


Figura 31 – Número de *crossings* no teste de habituação ao campo aberto de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 10) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado à sessão de treino.

Em relação ao número de *rearings* (Fig. 32), não houve diferença estatisticamente significativa entre as sessões de treino e teste em nenhum dos grupos avaliados.

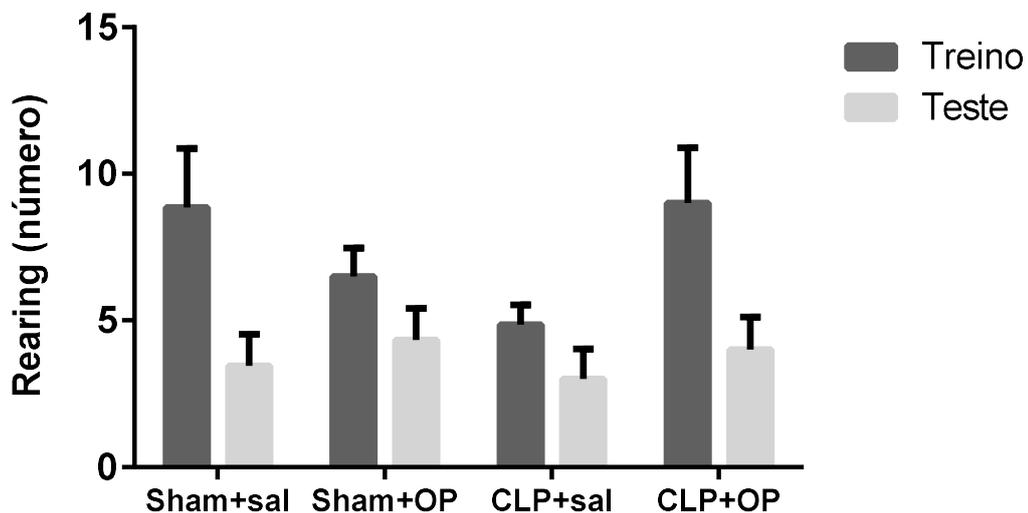


Figura 32 – Número de *rearings* no teste de habituação ao campo aberto de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 10) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

5.1.2.3. Teste de reconhecimento de objetos

A Figura 33 apresenta os resultados da avaliação da memória de curta duração no teste de reconhecimento de objetos, avaliada por meio do tempo dispendido para explorar diferentes objetos entre as sessões de treino e de teste (1,5 horas após o treino). Nesta avaliação não foi detectada diferença significativa em nenhum dos grupos estudados.

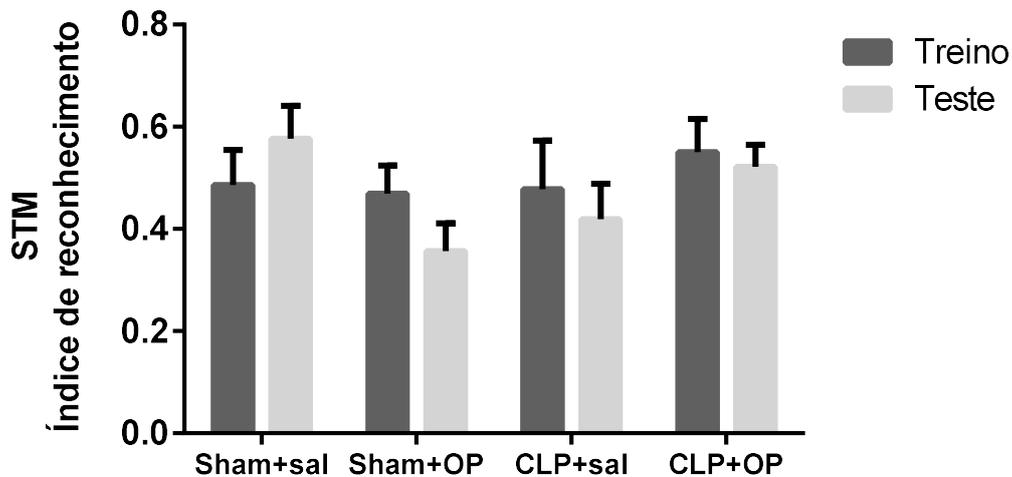


Figura 33 – Índice de reconhecimento de objetos em curta duração (STM) em ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como mediana [intervalo interquartil] (n = 10) analisados pelos testes de Mann Whitney e Wilcoxon.

A Figura 34 apresenta os resultados da avaliação da memória de longa duração no teste de reconhecimento de objetos (24 horas após a sessão de treino). Observou-se que os animais com sepse (grupo CLP+sal) dispenderam tempos similares para explorar o objeto A, na sessão de treino, e o objeto B, na sessão de teste, o que indica prejuízo de memória. Todavia, animais com sepse e tratados com OP demonstraram explorar por mais tempo o novo objeto durante a sessão de teste, indicando que o tratamento com OP preveniu o dano à memória avaliada pelo reconhecimento de objetos.

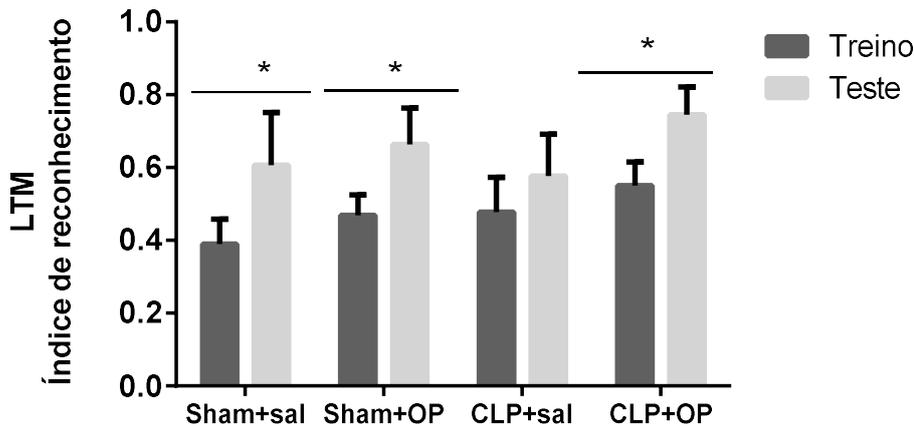


Figura 34 – Índice de reconhecimento de objetos em longa duração (LTM) em ratos submetidos à sepse polimicrobiana e tratados com emulsão lipídica rica em óleo de peixe. Dados expressos como mediana [intervalo interquartil] (n = 10) analisados pelos testes de Mann Whitney e Wilcoxon. *: comparado à sessão de treino.

5.2. DISCUSSÃO

Neste estudo evidenciou-se o papel neuroprotetor desempenhado por uma emulsão lipídica rica em óleo de peixe em um modelo animal de sepse polimicrobiana. Os resultados encontrados indicam que o tratamento com OP preveniu a alteração na permeabilidade da BHE e diminuiu importantes marcadores de inflamação e dano oxidativo, enquanto elevou as concentrações de neurotrofina e preveniu o dano cognitivo em longo prazo em ratos adultos com sepse.

A sepse é uma síndrome caracterizada pela associação de um estímulo infeccioso e uma resposta inflamatória sistêmica decorrente da produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e espécies reativas derivadas de oxigênio e nitrogênio por células do sistema imune ou pelo dano ao endotélio³¹⁰. Sabe-se que vários mecanismos, dentre eles a inflamação e a alteração na permeabilidade da BHE, podem levar à morte neuronal na fase inicial da sepse e ao dano cognitivo permanente^{311,312}.

A BHE possui mecanismos funcionais que regulam sua permeabilidade seletiva e proteção ao SNC, e estes mecanismos podem sofrer alterações importantes devido a condições e injúrias específicas, dentre eles a inflamação e o estresse oxidativo^{80,81}. Através do nervo vago e dos órgãos circunventriculares a resposta inflamatória na periferia estimula a ativação de células do SNC (por

exemplo, microglias), com consequente estímulo para a cascata do fator de transcrição NF-kB e liberação excessiva de mediadores inflamatórios⁵⁴. Em resposta, células do sistema imune na periferia, por exemplo os neutrófilos, são recrutadas a invadir o tecido encefálico e perpetuar a cascata da inflamação³¹³, tendo em vista que os neutrófilos também sintetizam mediadores inflamatórios capazes de modificar os componentes estruturais que mantêm a permeabilidade seletiva da BHE. Desta maneira, controlar o acúmulo de neutrófilos pode impactar a disfunção da BHE e a resposta inflamatória⁷⁶.

Os achados deste estudo apontam que a sepse alterou a permeabilidade da BHE nas três estruturas avaliadas. Além disso, notou-se um aumento na atividade da MPO nos tecidos corticais (córtex pré-frontal e córtex total), indicando o recrutamento aumentado de neutrófilos para ambas as regiões do encéfalo, o que está de acordo com achados prévios^{2,314-316}. Em contrapartida, percebeu-se que o tratamento com OP preveniu a alteração na permeabilidade da BHE e diminuiu a atividade da MPO nos ratos com sepse. Até o momento, estes achados considerados são inovadores, tendo em vista a carência de evidências a respeito do efeito protetor desempenhado pelo OP na disfunção cerebral causada pela sepse. Em órgãos periféricos, no entanto, pesquisas indicam que o OP pode atenuar a resposta inflamatória e a disfunção hepática em camundongos²² e a disfunção pulmonar em ratos²³, ambos após a indução de sepse.

Nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) são dois produtos do metabolismo do NO ³¹⁷ que desempenham funções importantes em condições fisiológicas, dentre elas a participação na neurotransmissão, regulação do sistema imune, plasticidade sináptica¹²⁰ e eliminação de O_2^- para evitar reações oxidativas; no entanto, em circunstâncias inflamatórias, a produção de NO pode aumentar drasticamente e favorecer a nitrosação e oxidação³¹⁸. Observou-se na atual pesquisa que os metabólitos do NO apresentaram uma tendência de aumento após a sepse, embora sem diferença estatisticamente significativa, e o tratamento com OP não alterou este marcador.

As citocinas são importantes marcadores do processo inflamatório, e as concentrações das citocinas IL-1 β e IL-10 foram avaliadas neste estudo. IL-1 β é uma citocina com potente ação pró-inflamatória sintetizada principalmente por monócitos, macrófagos, células dendríticas e *natural killers*³¹⁹. Suas funções incluem estimular células endoteliais a secretarem moléculas de adesão para recrutar células

inflamatórias até o tecido lesionado, induzir a síntese de mediadores inflamatórios como cicloxigenase (COX)-1 e induzível NOS (iNOS) e anticorpos³²⁰. Além disso, IL-1 β pode modular a sobrevivência de células neuronais e a memória hipocampal³¹⁹. Por outro lado, IL-10 é produzida por monócitos, células Th2 e células B, e após a sua ligação ao receptor, IL-10 suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas por células ativadas³²¹. É importante ressaltar que a IL-10, mesmo exercendo papel anti-inflamatório, as concentrações desta citocinas estão elevadas em indivíduos com sepse, e esta situação é considerada um preditor de severidade e mortalidade, sugerindo imunossupressão^{322,323}.

Observou-se que a sepse elevou as concentrações de IL-1 β e IL-10 no hipocampo e córtex total, enquanto que o tratamento com OP reduziu as concentrações de IL-1 β em todas as estruturas avaliadas e diminuiu os valores hipocampais de IL-10. Camundongos com insuficiência renal aguda após sepse e tratados com OP apresentaram aumento nas concentrações de IL-10 no lavado peritoneal em 24 horas após a indução de sepse, enquanto que os valores de IL-1 β encontraram-se elevados, porém sem significância estatística; três dias após a indução de sepse este cenário inverteu-se²¹⁸. Em ratos com insuficiência pulmonar após sepse o tratamento endovenoso com OP reduziu as concentrações plasmáticas de IL-10 cinco dias após a indução de sepse²³. A produção de citocinas apresenta variação entre os órgãos em virtude da susceptibilidade de cada tecido ao dano causado pela sepse, e o tecido encefálico revela-se altamente susceptível devido ao seu elevado conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados e de metais, demanda aumentada por oxigênio, grande produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, além da sua modesta defesa antioxidante, tornando-se um órgão rapidamente afetado pela sepse^{124,324}.

Sabe-se que o OP desempenha funções anti-inflamatórias e imunomodulatórias, no entanto os mecanismos de ação ainda não são completamente descritos na literatura. Uma possível ação envolve a metabolização do OP em mediadores bioativos anti-inflamatórios²²¹. Os ácidos graxos (AG) n-6 (ácido araquidônico; 20:4 n-6) e n-3 podem ser encontrados em fosfolipídeos de membranas celulares e servir como precursores de diferentes mediadores eicosanoides, como prostaglandinas (PGs), tromboxanos e leucotrienos (LTs). Tendo em vista que células inflamatórias dispõem de uma elevada proporção de AG n-6/n-3, o ácido araquidônico é o principal substrato para a produção de eicosanoides

primordialmente pró-inflamatórios. A ingestão de AG n-3 derivados do OP aumenta a incorporação destes nas membranas fosfolipídicas em detrimento do ácido araquidônico, o que favorece a síntese de eicosanoides com menor capacidade pró-inflamatória, por isso os AG n-3 são tidos como anti-inflamatórios³²⁵.

Outra possível ação inclui a geração de compostos lipídicos responsáveis por promover e/ou acelerar a resolução da inflamação. Estes compostos derivam dos AG EPA e DHA e são chamados de lipoxinas, resolvinas e protectinas. Tais mediadores atuam no reestabelecimento da homeostase tecidual sem induzir imunossupressão, por exemplo ao controlar a infiltração de leucócitos, ao ativar a fagocitose dos macrófagos e apoptose celular e estimular a expressão de moléculas responsáveis pela defesa antimicrobiana³²⁶.

A terceira possibilidade envolve a modulação da expressão gênica que decodifica a produção de mediadores inflamatórios, ao invés de simplesmente reduzir a produção de eicosanoides. Isso significa que os AG n-3 podem modificar a atividade de fatores de transcrição como o NF- κ B e/ou PPAR- γ . Em relação ao NF- κ B, sua ativação acontece por estímulos inflamatórios extracelulares, levando à síntese de mediadores inflamatórios. Ao contrário, o PPAR- γ regula diretamente a expressão de genes inflamatórios e interfere na ativação de NF- κ B. Desta maneira, os AG n-3 parecem melhorar a atividade de PPAR- γ e negativamente interferir na ativação de NF- κ B²¹⁰.

Nesta pesquisa avaliou-se também o impacto do OP no estresse oxidativo. O organismo possui sistemas que controlam a produção de espécies reativas no sentido de manter suas concentrações dentro de níveis fisiológicos. Todavia, este equilíbrio pode ser alterado quando há um aumento no número de compostos sofrendo auto-oxidação, redução na quantidade de substâncias antioxidantes, inativação/síntese de enzimas endógenas antioxidantes ou a combinação de dois ou mais destes fatores¹²³.

Evidências prévias demonstram a ocorrência de dano oxidativo a proteínas e lipídeos após a sepse, tanto em órgãos periféricos^{116,157,158,327}, quanto no SNC^{12,156}. Foi possível notar que a carbonilação proteica aumentou significativamente em todas as estruturas cerebrais, o que está de acordo com outros estudos^{315,316}, enquanto que a peroxidação lipídica não se mostrou elevada nos animais com sepse. Apesar de pesquisas anteriores indicarem achados diferentes, especula-se que tal resultado

possa ter relação com a intensidade da sepse – considerando que se induziu sepse moderada neste estudo – e a variabilidade animal.

A sepse também altera o sistema antioxidante endógeno. A enzima SOD é fundamental para a proteção celular ao catalisar a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio; posteriormente, a CAT e a GPx transformam o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, tornando-as também essenciais para o sistema antioxidante¹³⁰. Nesta pesquisa notou-se que a atividade da CAT teve uma tendência de redução após a indução de sepse, enquanto que a administração de OP não foi efetiva em prevenir esta alteração, apesar de ter elevado a atividade desta enzima nos animais sham. É importante ressaltar que o cérebro expressa quantidades muito pequenas de enzimas antioxidantes; além disso, a CAT encontra-se presente especialmente em eritrócitos e hepatócitos¹²¹, o que pode ter influenciado os resultados aqui apresentados. Ademais, não podemos descartar a possível influência exercida pela enzima GPx nos achados deste estudo, tendo em vista sua ação similar com a catalase.

Além das funções anti-inflamatórias e imunomodulatórias, o OP também parece atuar como um composto antioxidante, apesar de tais mecanismos também serem pouco elucidados na literatura. Em ratos diabéticos, o uso de dieta rica em OP reduziu marcadores de oxidação e estimulou a defesa antioxidante hepática aumentando a atividade e expressão da CAT³²⁸. Ratos asmáticos suplementados oralmente com OP apresentaram aumento na atividade de enzimas antioxidantes e redução de marcadores de oxidação no pulmão³²⁹. Resultados semelhantes foram visualizados em eritrócitos de ratos suplementados com OP³³⁰ e em cultura celular de macrófagos³³¹. Em humanos, também se visualizou aumento na expressão de genes para enzimas antioxidantes após o uso de OP³³², tendo como principal mecanismo de ação a ativação de PPAR- γ ³³³.

Os efeitos da inflamação e do estresse oxidativo sobre as concentrações de BDNF e a função cognitiva também foram determinados nesta pesquisa. Os testes de habituação ao campo aberto e de reconhecimento de objetos apontaram a ocorrência de dano à memória e ao aprendizado em 10 dias após a indução de sepse, corroborando com a literatura^{3,113,293}, tendo em vista que a inflamação periférica pode afetar severamente o funcionamento do SNC, incluindo a memória e a cognição³³⁴. Em contrapartida, animais com sepse tratados com OP apresentaram comportamento indicativo de função cognitiva sem comprometimento, o que

corroborar com achados em modelos animais de diabetes^{335,336}, isquemia cerebral³³⁷, e encefalopatia hepática³³⁸.

O BDNF é a neurotrofina mais abundante do SNC de mamíferos, sendo a plasticidade sináptica sua principal função²⁹⁷. Assim, o BDNF atua na neurogênese e sinaptogênese²⁹⁶, modula a força de sinapses já existentes e contribui para a formação de novos contatos sinápticos. Desta maneira, a alteração na função do BDNF pode afetar a memória e o aprendizado³³⁹. Biff e colaboradores demonstraram que a sepse estimula as respostas inflamatórias e oxidativas em 24 horas, e que isso esteve associado com redução nas concentrações de BDNF e pior performance cognitiva em 30 dias após a indução da doença¹³. Achados semelhantes foram visualizados também em 10 dias³¹⁶ e 17 dias após a cirurgia de CLP³⁴⁰. Não apenas a sepse, mas outras condições que afetam o SNC também interferem nas concentrações de BDNF, como meningite^{98,307}, lesão cerebral traumática³⁰⁴, derrame³⁴¹, depressão³⁴² e esquizofrenia³⁴³. Ainda, a relação entre elevadas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, redução nos valores de BDNF e alteração no funcionamento neuronal hipocampal já foi descrita³⁴⁴, enquanto que o bloqueio da inflamação parece reverter, ao menos parcialmente, estas alterações³⁴⁵.

Neste contexto, observou-se que o OP aumentou significativamente as concentrações de BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo dos animais com sepse. Efeitos similares, além da melhora na performance cognitiva, foram descritos anteriormente em um modelo animal de depressão³⁴². Ratos suplementados com OP como uma terapia antidepressiva adjuvante apresentaram aumento do volume hipocampal e da expressão de BDNF³⁴⁶. Achados interessantes também foram vistos em modelos de lesão cerebral traumática³⁰⁴ e de estresse de contenção³⁴⁷.

Os benefícios desempenhados pelo OP nas concentrações de BDNF parecem estar relacionados ao fator de transcrição chamado proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB). BDNF liga-se ao seu receptor (receptor de tropomiosina quinase B – TrkB) e leva à ativação de CREB, o qual é um fator chave na modulação da sobrevivência celular, memória e aprendizado^{302,305,348}. Já foi demonstrado que a redução de AG n-3 nas membranas celulares, em especial DHA, resultou em menor ativação de TrkB e CREB, possivelmente por diminuição na fluidez da membrana celular e performance de receptores³⁴⁹. Além disso, CREB e NF-κB parecem atuar em oposição no que diz respeito à função do SNC: enquanto

CREB é essencial para a plasticidade e crescimento neuronal, NF- κ B favorece a indução de genes inflamatórios e oxidativos³⁰⁵.

Considerando a importância da aplicação translacional do OP, optou-se por utilizar o OP como emulsão lipídica enriquecida com óleo de peixe, em detrimento de versões encapsuladas, em especial porque indivíduos com sepse encontram-se em situação crítica, predominantemente internados em unidades de tratamento hospitalar intensivo; estes indivíduos costumam receber suporte nutricional por via enteral e/ou parenteral, em especial dada a dificuldade ou incapacidade de deglutição ou absorção de nutrientes, o que inviabiliza o uso de cápsulas; Omegaven[®] é uma emulsão lipídica para aplicação parenteral e seu uso tem sido extensivamente elucidado na literatura como uma boa fonte de AG n-3 para doentes críticos. Contudo, este estudo possui limitações. Neste modelo experimental o OP foi administrado imediatamente após a indução de sepse; na prática clínica, a sepse costuma ser diagnosticada horas ou dias após seu desenvolvimento. Além disso, administrou-se Omegaven[®] por via oral, e não por via intravenosa como recomendado pelo fabricante; optou-se por esta via de administração com base em um estudo prévio que indicou segurança e efetividade do produto, além de evitar um segundo e invasivo procedimento cirúrgico para inserção de acesso venoso.

Em conclusão, os resultados desta pesquisa demonstram, pela primeira vez, o efeito desempenhado pela emulsão lipídica rica em óleo de peixe na diminuição da inflamação e do estresse oxidativo no encéfalo de ratos com sepse. Além disso, evidenciou-se o efeito do OP em elevar as concentrações de BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo, duas regiões relacionadas aos processos de aprendizado e memória, com consequente modulação da capacidade cognitiva dos animais com sepse. Neste sentido, a aplicação do OP torna-se de importante relevância na prática clínica.

CAPÍTULO 6: ADMINISTRAÇÃO ASSOCIADA DE ÁCIDO α -LIPOICO E ÓLEO DE PEIXE

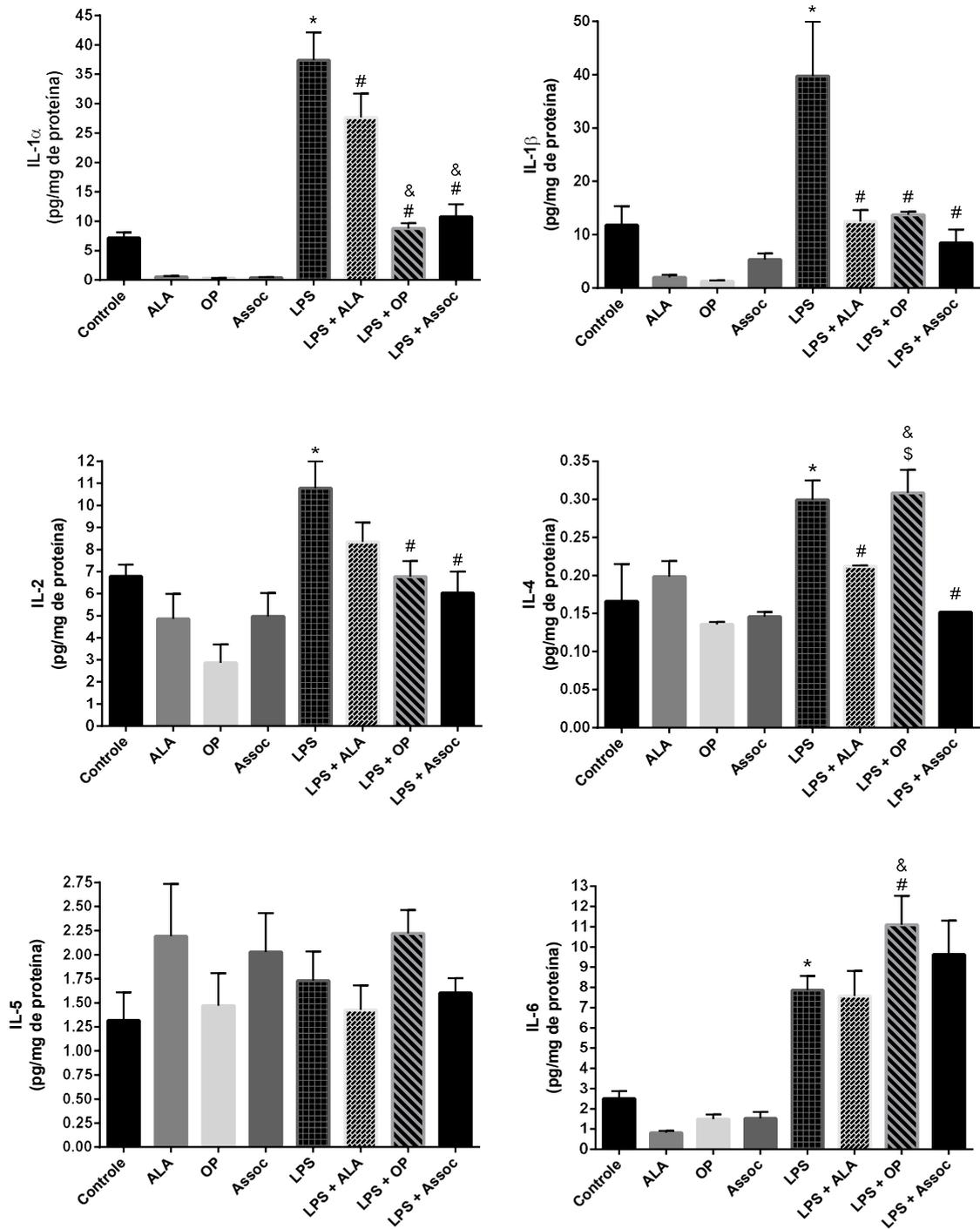
6.1. RESULTADOS

6.1.1. Determinações *in vitro*

6.1.1.1. Concentração de citocinas

As concentrações de citocinas sintetizadas em cultura primária de microglia estão descritas nas Figuras 35A e 35B. Quando estimuladas com LPS, houve aumento significativo nas concentrações de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 (Fig. 35A) e IL-18, INF- γ e TNF- α (Fig. 35B). Quando as células foram tratadas concomitantemente com LPS e a associação dos nutracêuticos observou-se redução significativa nas concentrações de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-18 e IFN- γ .

A



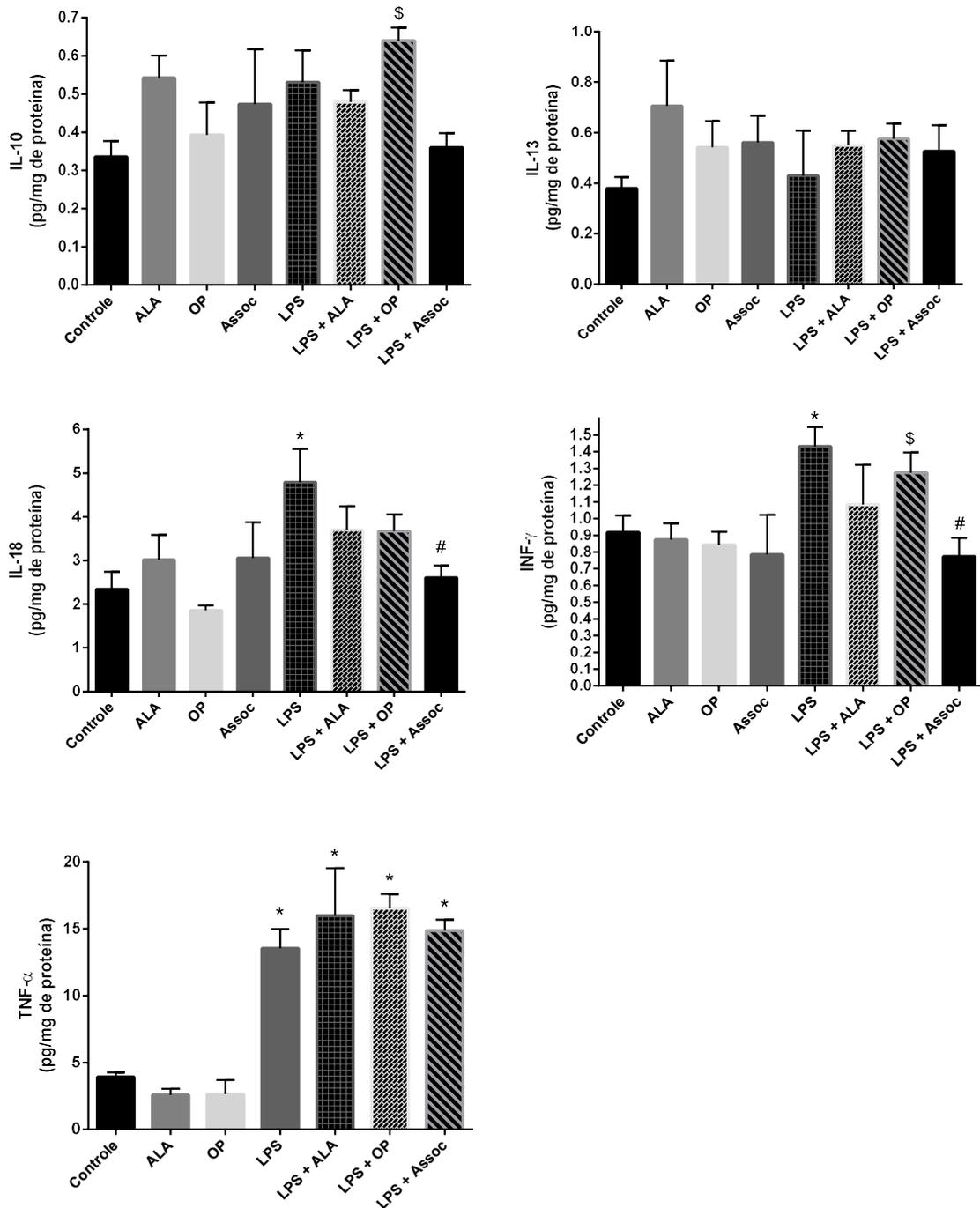
B

Figura 35 – Concentração de citocinas (A e B) em cultura primária de microglia co-tratada durante 24 horas com lipopolissacarídeo (LPS), ácido α -lipoico (ALA), emulsão lipídica rica em óleo de peixe (OP) ou com a associação de ALA + OP (Assoc). Dados expressos como média \pm desvio-padrão de cultura em triplicada, analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao controle; #: comparado ao LPS; &: comparado ao LPS+ALA; \$: comparado ao LPS+Assoc.

6.1.2. Determinações em 24 horas

6.1.2.1. Concentração de citocinas

A Figura 36 retrata as concentrações de TNF- α nas estruturas cerebrais em 24 horas após a indução de sepse. A indução de sepse (grupo CLP+sal) elevou as concentrações de TNF- α no córtex total, enquanto que a administração isolada de OP e a associação de ALA+OP reduziu significativamente estes valores no córtex dos ratos com sepse (grupos CLP+OP e CLP+Assoc). Não houve alteração estatisticamente significativa no córtex pré-frontal e hipocampo.

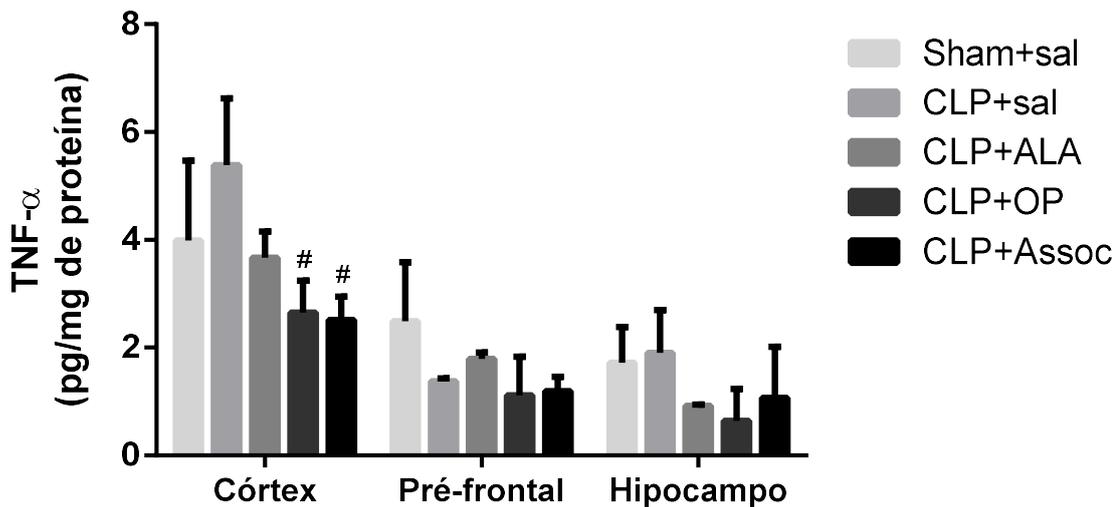


Figura 36 – Concentração de TNF- α no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA), emulsão lipídica rica em óleo de peixe (OP) ou com a associação de ALA + OP (Assoc). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. #: comparado ao grupo CLP+sal.

Em relação à citocina IL-1 β (Fig. 37), observou-se um aumento significativo nas concentrações no córtex total e hipocampo dos ratos com sepse, em comparação ao grupo controle (Sham+sal), exceto nos animais do grupo CLP+Assoc. No córtex pré-frontal, o uso isolado de OP e da associação promoveu menores concentrações desta citocina, em comparação ao grupo CLP+sal. No hipocampo o tratamento com a associação reduziu significativamente as concentrações de IL-1 β , em comparação ao grupo CLP+sal.

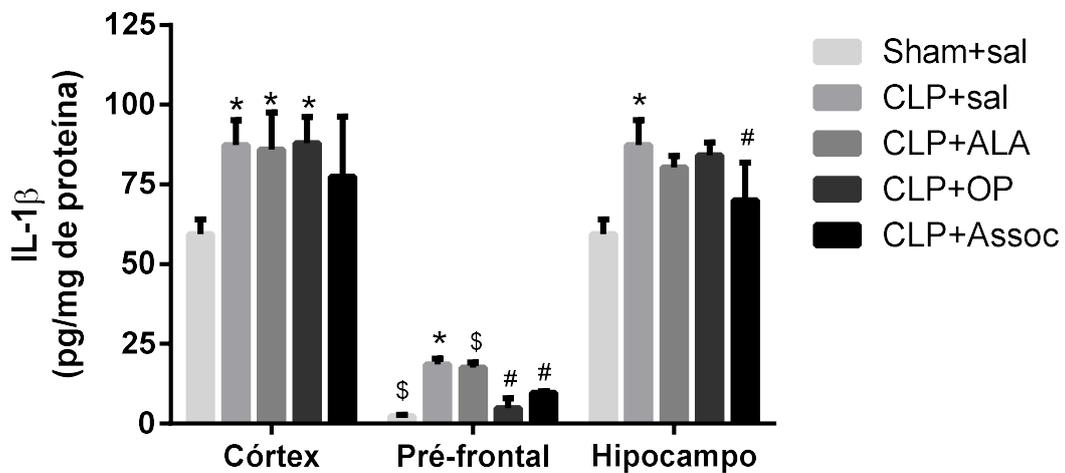


Figura 37 – Concentração de IL-1 β no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA), emulsão lipídica rica em óleo de peixe (OP) ou com a associação de ALA + OP (Assoc). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal; \$: comparado ao grupo CLP+Assoc.

A Figura 38 apresenta os resultados referentes à citocina IL-10 nas três estruturas avaliadas. Não foi observada alteração estatisticamente significativa para este parâmetro.

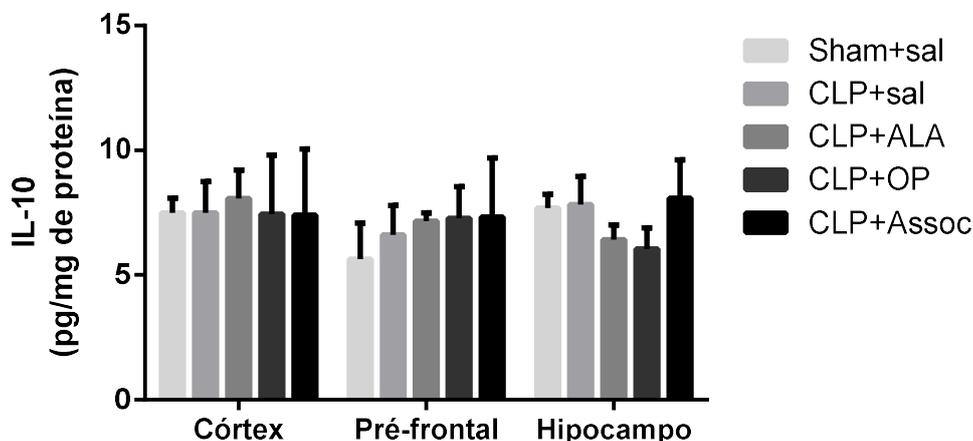


Figura 38 – Concentração de IL-10 no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA), emulsão lipídica rica em óleo de peixe (OP) ou com a associação de ALA + OP (Assoc). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

6.1.2.2. Atividade da mieloperoxidase

A atividade da enzima MPO está representada na Figura 39. No córtex total é possível observar que a sepse estimulou o aumento significativo na atividade da MPO, em comparação ao grupo controle (Sham+sal), e que este aumento foi prevenido apenas com a administração da associação (grupo CLP+Assoc). No córtex pré-frontal os tratamentos isolados (grupos CLP+OP e CLP+ALA) e a associação (grupo CLP+Assoc) se mostraram efetivos em prevenir o aumento na atividade da enzima, em comparação ao grupo CLP+sal. No hipocampo os grupos tratados com ALA e OP apresentaram valores reduzidos na atividade da MPO, em comparação ao grupo CLP+sal, enquanto que o uso da associação não se mostrou efetiva em reduzir a atividade desta enzima.

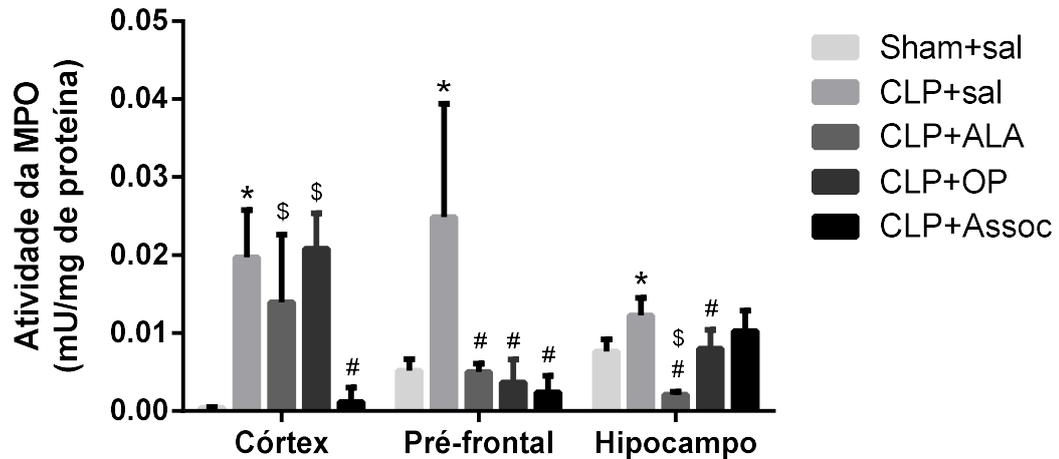


Figura 39 – Atividade da MPO no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA), emulsão lipídica rica em óleo de peixe (OP) ou com a associação de ALA + OP (Assoc). Dados expressos como média \pm desvio-padrão ($n = 5 - 8$) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal; \$: comparado ao grupo CLP+Assoc.

6.1.2.3. Dano oxidativo a proteína

O dano oxidativo a proteínas está representado na Fig. 40. Em todas as estruturas houve aumento nas concentrações de proteínas carboniladas após a indução de sepse (grupo CLP+sal). No córtex total e hipocampo os tratamentos isolados (grupos CLP+OP e CLP+ALA) e a associação (grupo CLP+Assoc) reduziram significativamente as concentrações deste marcador. No córtex pré-frontal houve redução das proteínas carboniladas com a administração de OP e da associação.

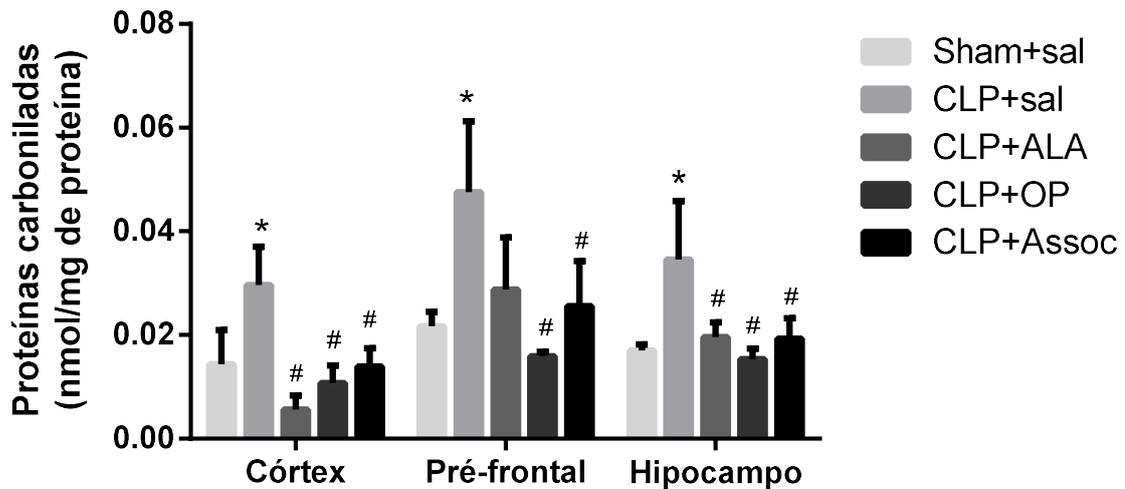


Figura 40 – Concentração de proteínas carboniladas no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA), emulsão lipídica rica em óleo de peixe (OP) ou com a associação de ALA + OP (Assoc). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal.

6.1.2.4. Atividade de enzimas antioxidantes

As atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT estão ilustradas nas Figuras 41A e B, respectivamente. Em relação à SOD, notou-se que o uso isolado de OP (grupo CLP+OP) aumentou significativamente a atividade desta enzima no córtex pré-frontal, em comparação aos grupos CLP+sal e CLP+ALA. No hipocampo a sepse (grupo CLP+Sal) reduziu significativamente a atividade da SOD, enquanto que o tratamento com ALA (grupo CLP+ALA) aumentou significativamente este marcador. No córtex total não houve diferença significativa.

Considerando a CAT, houve redução da atividade desta enzima no córtex total de todos os grupos com sepse, em comparação aos animais controle (grupo Sham+sal). No córtex pré-frontal e no hipocampo o uso da associação (grupo CLP+Assoc) aumentou significativamente a atividade da CAT, em comparação ao grupo CLP+sal.

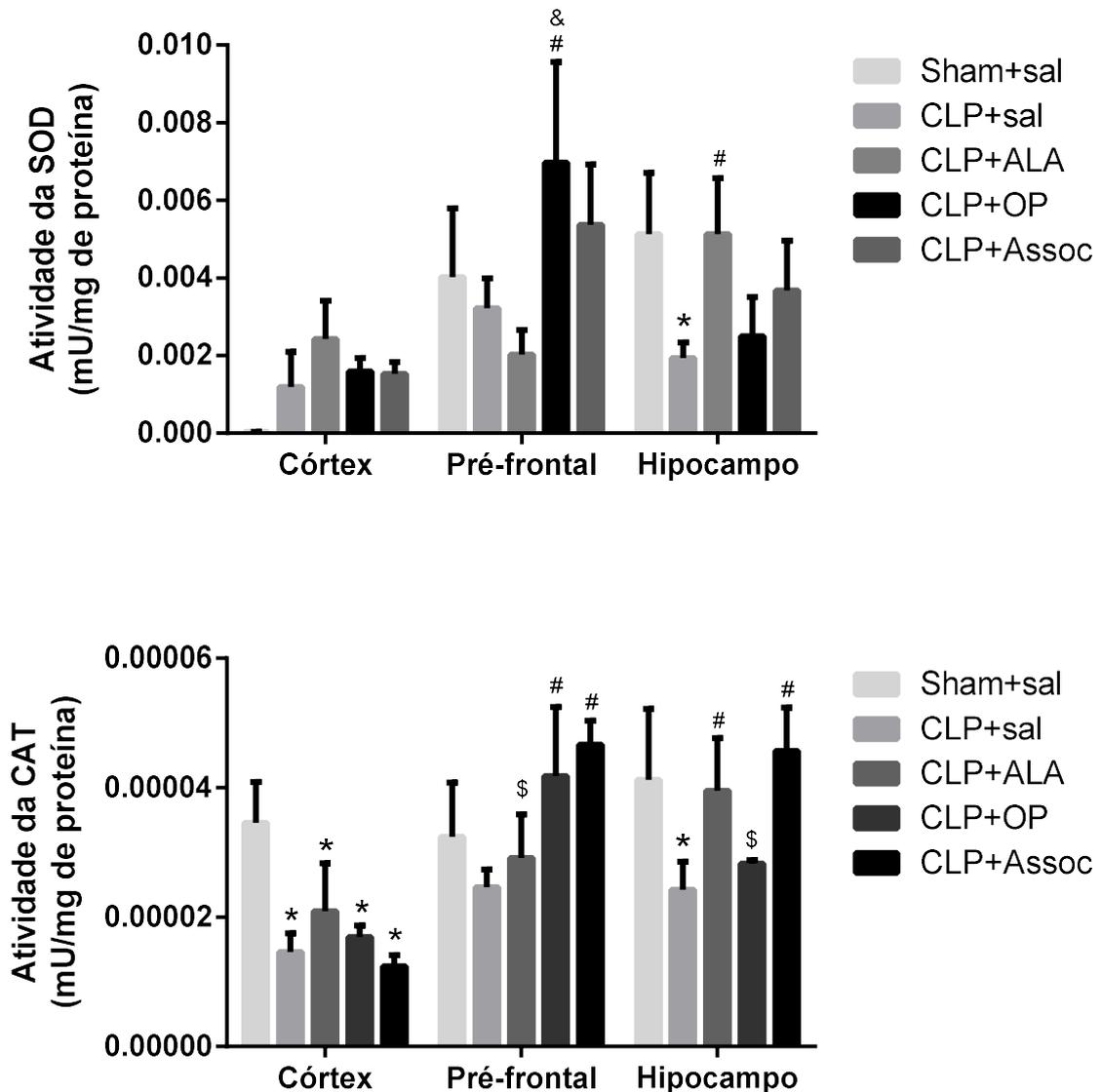


Figura 41 – Atividade das enzimas SOD (A) e CAT (B) no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA), emulsão lipídica rica em óleo de peixe (OP) ou com a associação de ALA + OP (Assoc). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal; \$: comparado ao grupo CLP+Assoc; &: comparado ao grupo CLP+ALA.

6.1.3. Determinações em 10 dias

6.1.3.1. Sobrevida

A Figura 42 apresenta a análise de sobrevida. Observou-se que o grupo controle (Sham+sal) teve 90% de sobrevida durante os 10 dias de

acompanhamento. Os animais dos grupos CLP+sal e CLP+ALA apresentaram menor sobrevivência (75% e 66%, respectivamente), enquanto que os animais com sepse tratados com OP (CLP+OP) apresentaram 93% de sobrevivência e aqueles tratados com a associação (CLP+Assoc) apresentaram 100% de sobrevivência. Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos.

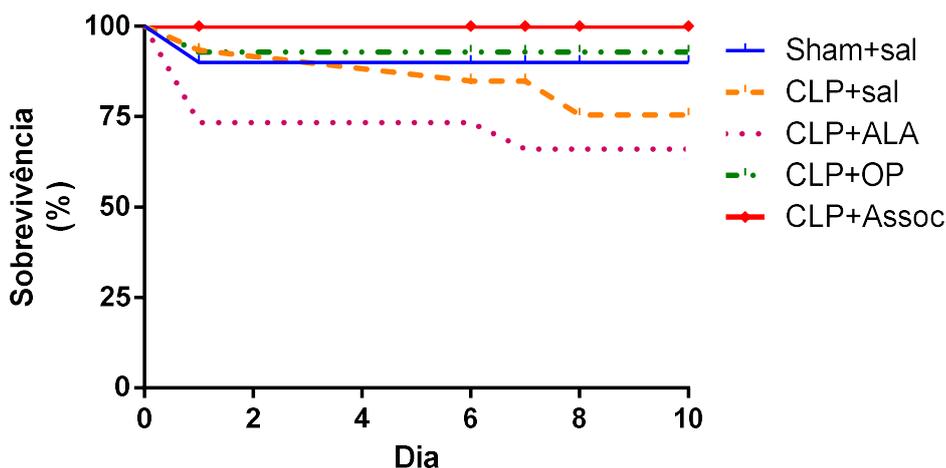


Figura 42 - Curva de Kaplan-Meier para análise de sobrevivência de ratos (n = 10) submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA), emulsão lipídica rica em óleo de peixe (OP) ou com a associação de ALA + OP (Assoc), acompanhados por 10 dias. Dados analisados por long-rank.

6.1.3.2. Concentração de BDNF

A Figura 43 descreve os resultados referentes à concentração de BDNF nas estruturas avaliadas em 10 dias após a indução de sepse. É possível observar que a administração da associação elevou significativamente as concentrações de BDNF em todas as estruturas avaliadas, em comparação ao grupo CLP+sal.

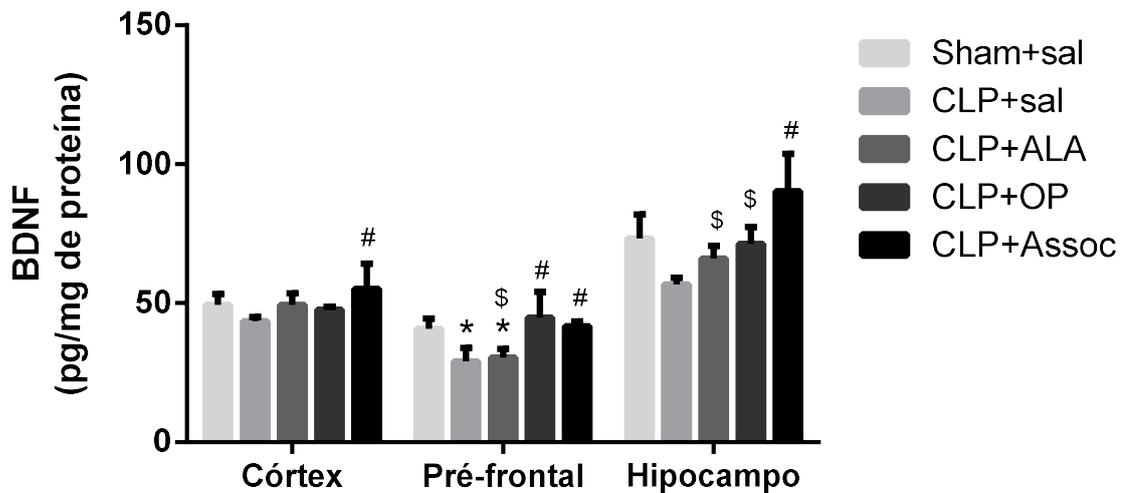


Figura 43 – Concentração de BDNF no córtex total, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA), emulsão lipídica rica em óleo de peixe (OP) ou com a associação de ALA + OP (Assoc). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 5 - 8) analisados por ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado ao grupo Sham+sal; #: comparado ao grupo CLP+sal; \$: comparado ao grupo CLP+ALA; &: comparado ao grupo CLP+OP.

6.1.3.3. Teste de habituação em campo aberto

O comportamento dos animais no teste de habituação em campo aberto está representado nas Figuras 44 e 45. Observou-se que o grupo CLP+sal não apresentou diferença estatisticamente significativa no número de *crossings* (Fig. 45) entre as sessões de treino e de teste. No entanto, os animais dos grupos Sham+sal, CLP+ALA e CLP+Assoc apresentaram uma redução significativa no número de *crossings* na sessão de teste, comparada à sessão de treino.

Em relação ao número de *rearings* (Fig. 46), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.

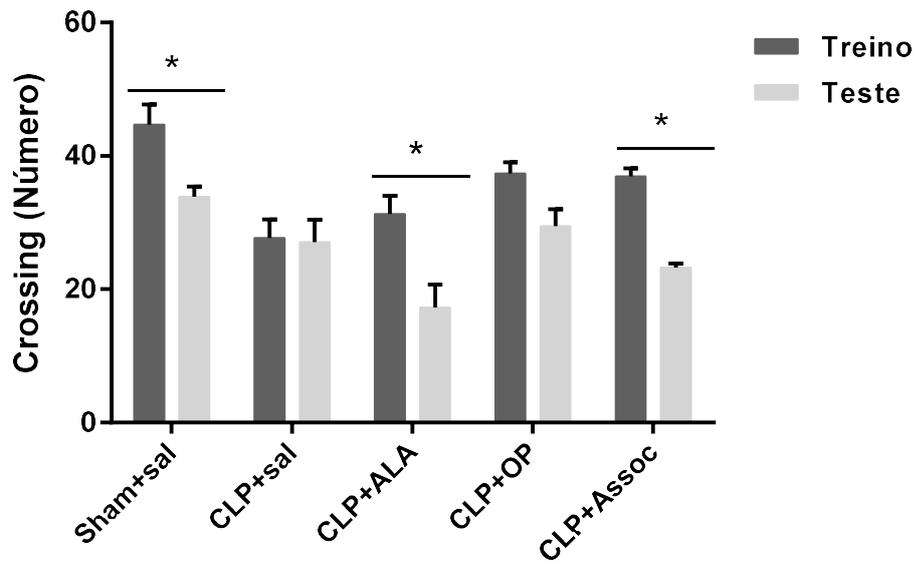


Figura 44 – Número de *crossings* no teste de habituação ao campo aberto de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA), emulsão lipídica rica em óleo de peixe (OP) ou com a associação de ALA + OP (Assoc). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 10) analisados por ANOVA e pós-teste de Tukey. *: comparado à sessão de treino.

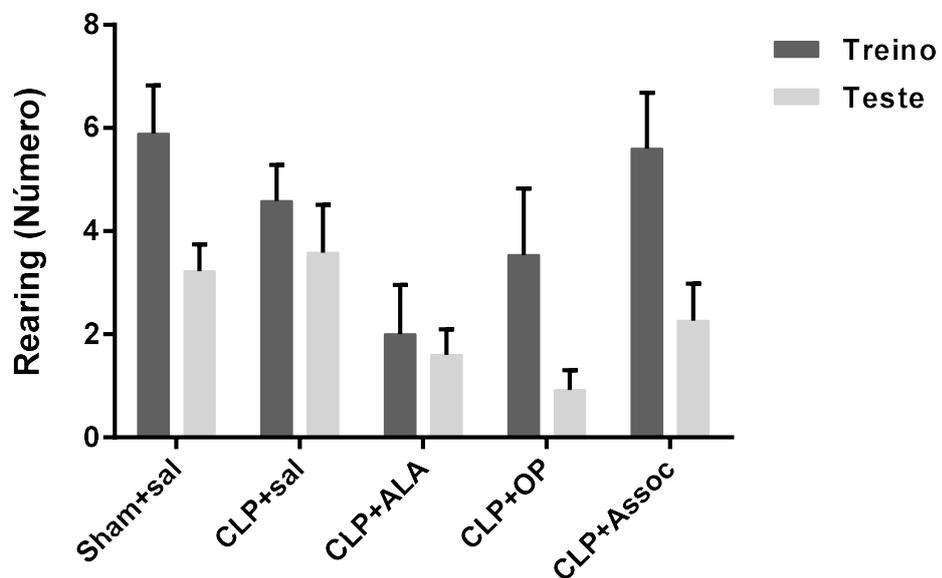


Figura 45 – Número de *rearings* no teste de habituação ao campo aberto de ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA), emulsão lipídica rica em óleo de peixe (OP) ou com a associação de ALA + OP (Assoc). Dados expressos como média \pm desvio-padrão (n = 10) analisados por ANOVA e pós-teste de Tukey.

6.1.3.4. Teste de reconhecimento de objetos

A Figura 46 ilustra os resultados da avaliação da memória de curta duração no teste de reconhecimento de objetos, avaliada por meio do tempo dispendido para explorar diferentes objetos entre as sessões de treino e de teste (1,5 horas após o treino). Percebeu-se que os animais com sepse (grupo CLP+sal) e tratados com OP (grupo CLP+OP) não apresentaram diferença significativa no tempo de exploração, enquanto que os animais controle (grupo Sham+sal) e os ratos tratados com ALA e com a associação dispenderam maior tempo para explorar o novo objeto.

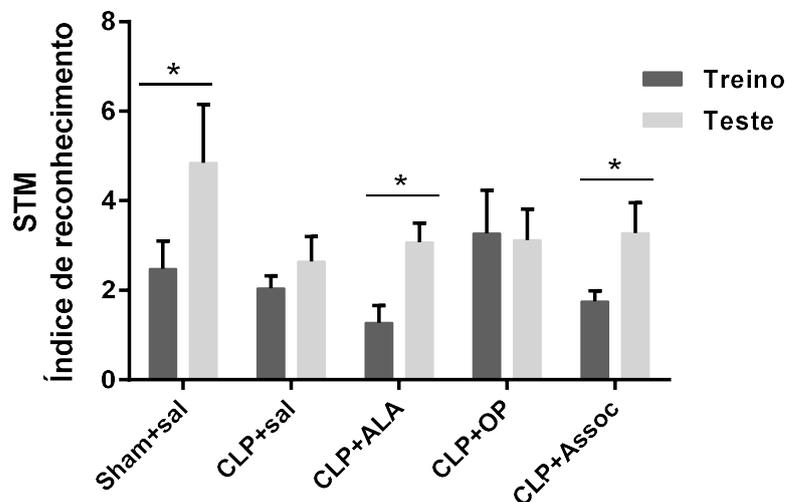


Figura 46 – Índice de reconhecimento de objetos em curta duração (STM) em ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA), emulsão lipídica rica em óleo de peixe (OP) ou com a associação de ALA + OP (Assoc). Dados expressos como mediana [intervalo interquartil] ($n = 10$) analisados pelos testes de Mann Whitney e Wilcoxon. *: comparado à sessão de treino.

A Figura 47 exibe os resultados da avaliação da memória de longa duração no teste de reconhecimento de objetos (24 horas após a sessão de treino). Observou-se que os animais com sepse (grupo CLP+sal) dispenderam tempos similares para explorar os objetos nas sessões de treino e teste, o que indica alteração de memória. Todavia, animais controle (grupo Sham+sal) e com sepse tratados com ALA e com a associação demonstraram explorar por mais tempo o novo objeto durante a sessão de teste, indicando adequado funcionamento cognitivo.

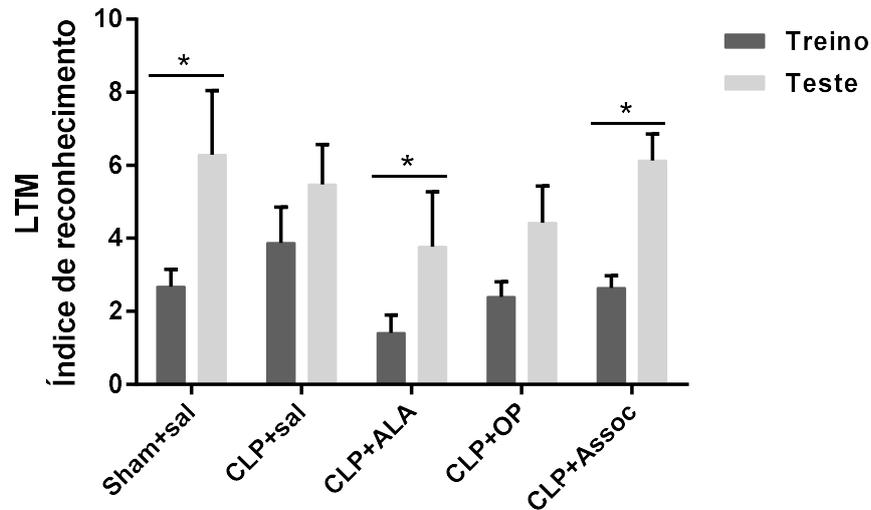


Figura 47 – Índice de reconhecimento de objetos em longa duração (LTM) em ratos submetidos à sepse polimicrobial e tratados com ácido α -lipoico (ALA), emulsão lipídica rica em óleo de peixe (OP) ou com a associação de ALA + OP (Assoc). Dados expressos como mediana [intervalo interquartil] (n = 10) analisados pelos testes de Mann Whitney e Wilcoxon. *: comparado à sessão de treino.

O Quadro 3 ilustra a síntese dos resultados obtidos com o estudo sobre o efeito da associação dos nutracêuticos na disfunção cerebral associada à sepse.

Quadro 3 – Síntese dos resultados do estudo da associação.

Variável	Córtex			Pré-frontal			Hipocampo		
	ALA	OP	Assoc	ALA	OP	Assoc	ALA	OP	Assoc
TNF- α		↓	↓						
IL-1 β					↓	↓			↓
IL-10									
MPO			↓	↓	↓	↓	↓	↓	
Carbonil	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓	↓
SOD					↑		↑		
CAT					↑	↑	↑		↑
BDNF			↑		↑	↑			↑

Legenda: ALA, CLP+ALA; OP, CLP+OP; Assoc, CLP+Assoc; (↑ ou ↓) $p < 0,05$ versus CLP+sal.

6.2 DISCUSSÃO

A pesquisa atual avaliou a capacidade neuroprotetora desempenhada pela associação de dois nutracêuticos, o ácido α -lipoico e o óleo de peixe, sobre marcadores inflamatórios *in vitro* e *in vivo*, indicadores de estresse oxidativo e de função cognitiva em ratos submetidos a um modelo de sepse polimicrobiana. Tendo em vista o papel predominantemente antioxidante desempenhado pelo ALA, bem como a ação anti-inflamatória proporcionada pelo OP, observou-se que o uso associado dos nutracêuticos diminuiu as concentrações de citocinas pró-inflamatórias e o infiltrado de neutrófilos, minimizou o dano oxidativo a proteínas, enquanto elevou a atividade de enzima antioxidante. Ainda, a associação aumentou as concentrações de neurotrofinas e preveniu o dano à memória e aprendizado.

Sabendo que a encefalopatia associada à sepse é uma disfunção caracterizada pela deterioração aguda e reversível do estado mental que afeta, em especial, aspectos comportamentais, cognitivos, de atenção e consciência³⁵⁰, e tendo em vista a ocorrência de alterações neuroinflamatórias na sepse, principalmente a ativação endotelial e microglial e o recrutamento de células leucocitárias^{351,352}, buscou-se inicialmente determinar a capacidade anti-inflamatória da associação dos nutracêuticos em cultura celular de microglias ativadas por LPS. A ativação com LPS na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estimulou a produção de interleucinas, dentre elas IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-18, além de INF- γ e TNF- α . Quando simultaneamente estimuladas por LPS e tratadas com a associação dos nutracêuticos houve redução nas concentrações microgliais de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-18 e INF- γ , enquanto que IL-6 e TNF- α permaneceram em valores próximos ao apresentado pelo grupo LPS. Resultados positivos também foram visualizados no experimento *in vivo*, já que a administração da associação reduziu as concentrações corticais de TNF- α e diminuiu as concentrações de IL-1 β no córtex pré-frontal e hipocampo, em comparação aos animais do grupo CLP+sal.

As citocinas são componentes essenciais da inflamação, pois regulam a resposta do sistema imunológico frente ao processo infeccioso. As interleucinas IL-1 α , IL-1 β e IL-6 e o fator TNF- α estão envolvidos na resposta inflamatória inicial e estimulam a produção de novos mediadores capazes de recrutar células inflamatórias³⁵³. Estas citocinas podem ser produzidas periféricamente ou no SNC, especificamente por neurônios e por células gliais, onde intermediarão a

neuroinflamação e a resposta ao dano tecidual³²⁰. Já a interleucina IL-18 favorece a síntese de IFN- γ por diversas células do sistema imune, como as *Natural Killers* (NK) e células T CD4 e CD8. Demonstrou-se que concentrações elevadas de IL-18 e IFN- γ estão associadas com pior prognóstico clínico e a severidade da sepse³²¹. Em relação à IL-6, demonstrou-se associação entre a ocorrência de *delirium* em seres humanos e o aumento nas concentrações plasmáticas e líquóricas desta citocina^{354,355}.

O LPS, uma endotoxina derivada de componentes da parede celular bacteriana, estimula a ativação de cascatas pró-inflamatórias e a síntese de mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β , ao se ligar a receptores *Toll-like* tipo 4 (TLR4)³⁵⁶. Sabe-se que tais mediadores inflamatórios produzidos periféricamente podem incitar o início da resposta inflamatória no SNC por meio de três vias: i) por receptores axonais do nervo vago que detectam a inflamação visceral; ii) pela entrada facilitada de citocinas em regiões do SNC deprivadas de BHE, chamadas de órgãos circunventriculares; e iii) pela interação direta de mediadores inflamatórios com receptores localizados nas células endoteliais da BHE, levando a uma cascata de ativação celular no SNC^{106,357}, incluindo a microglia^{54,258}.

As células microgliais podem ser ativadas em diferentes fenótipos, sendo o tipo M1 responsável pela produção de mediadores inflamatórios e por ações neurotóxicas, e o tipo M2 envolvido em funções remodeladoras e de reparo³⁵⁸. No entanto, a ativação microglial descompensada leva à síntese excessiva de citocinas e espécies reativas, as quais exacerbam a neuroinflamação. Por isso, a modulação da resposta inflamatória gerada por micróglia ativadas contribui para atenuar a neuroinflamação³⁵⁶. Neste sentido, observou-se que o tratamento *in vitro* com a associação dos nutracêuticos foi efetivo em diminuir as concentrações de citocinas, modulando a resposta inflamatória microglial. Estudos prévios em culturas celulares demonstraram o papel anti-inflamatório desempenhado pelo ALA^{273–275,359}, o qual pode atuar de maneira complementar ao já elucidado agente anti-inflamatório óleo de peixe^{360–363}.

Outro marcador de resposta inflamatória é o recrutamento de neutrófilos. Estas células são os principais intermediários do sistema imune a serem recrutados até o tecido inflamado em resposta à infecção⁸⁷, além de serem capazes de sintetizar mediadores inflamatórios, como produtos oxidantes, proteases e armadilhas extracelulares⁸⁶. A produção da enzima mieloperoxidase (MPO) é

considerada um marcador da infiltração tecidual de neutrófilos²⁴⁴. Esta informação é de fundamental importância, considerando que os neutrófilos são células próprias do tecido sanguíneo³⁶⁴, e a infiltração destas no SNC acontece devido à alteração na permeabilidade da barreira hematoencefálica³⁶⁵. Durante quadros de inflamação sistêmica, como na sepse, o infiltrado de neutrófilos pode ser exacerbado ou inapropriado em diferentes tecidos³⁶⁶. No presente estudo a sepse (grupo CLP+sal) aumentou significativamente a atividade da MPO nas três estruturas cerebrais avaliadas, corroborando com os resultados encontrados para o uso isolado do OP e de estudos prévios^{315,367,368}. A associação dos nutracêuticos mostrou-se efetiva em reduzir a atividade da MPO em ambas as estruturas corticais, enquanto que os usos isolados de ALA e de OP foram efetivos no córtex pré-frontal e hipocampo.

Os neutrófilos ativados são importantes fontes de produção de EROs e ERNs, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, ácido hipocloroso e óxido nítrico, e tais espécies podem ser sintetizadas pelas vias da NADPH oxidase e da óxido nítrico sintase (NOS), bem como pela ação catalítica desempenhada pela enzima MPO³⁶⁹. A produção exacerbada de espécies reativas está intimamente relacionada com a ocorrência de dano oxidativo a estruturas celulares¹²². Nesta pesquisa as concentrações de proteínas carboniladas foram utilizadas como marcador de dano oxidativo, e foi possível observar valores significativamente aumentados nos animais com sepse (grupo CLP+sal). A formação de carbonil é relativamente difícil de ser induzida, em comparação a outras formações proteicas derivadas da oxidação, por isso este marcador pode indicar a severidade do processo oxidativo celular e até disfunção proteica³⁷⁰. Foi possível observar que a administração associada dos nutracêuticos exerceu papel positivo na prevenção do dano oxidativo a proteínas nas três estruturas cerebrais, o que corrobora com achados prévios com o uso dos compostos isolados^{21,22,117} e com a associação do OP a diferentes antioxidantes^{371,372}.

Durante a sepse é possível observar alterações na atividade de enzimas antioxidantes endógenas, como a SOD e a CAT¹⁵⁷. Estas enzimas possuem ações complementares, sendo a atividade da SOD determinante na transformação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, enquanto a CAT transforma o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Isto significa que o aumento na atividade da SOD sem o concomitante aumento da atividade enzimática da CAT pode favorecer o dano oxidativo pelo aumento nas concentrações de peróxidos livres para reagirem com

lipídeos e metais¹¹⁶. Apesar de não ter promovido alterações significativas na atividade da SOD, observou-se que o tratamento com a associação dos nutracêuticos aumentou a atividade da CAT no córtex pré-frontal e no hipocampo dos animais com sepse. Desta maneira, os resultados desta pesquisa demonstram ações complementares da SOD e da CAT, especialmente no córtex pré-frontal e no hipocampo.

Evidências apontam que a neuroinflamação e o dano oxidativo visualizados agudamente influenciam a produção de neurotrofinas e a capacidade cognitiva em longo prazo^{98,307}. Neste sentido, objetivou-se determinar as concentrações de BDNF em 10 dias após a cirurgia de CLP. Foi possível observar que a administração da associação de nutracêuticos aumentou significativamente as concentrações de BDNF em todas as estruturas avaliadas. Isto refletiu na função cognitiva, avaliada também em 10 dias após a indução de sepse por meio dos testes de habituação ao campo aberto e de reconhecimento de objetos. Notou-se que a administração da associação, bem como de ALA isolado, preveniu o dano à memória e ao aprendizado, já que os animais apresentaram comportamento condizente com função cognitiva sem comprometimento. Resultados similares foram visualizados com a administração de OP e ácido ferúlico³⁷¹ e de OP e quercetina³⁷³.

Em relação à sobrevida, observou-se que a administração da associação dos nutracêuticos promoveu 100% de sobrevida, enquanto que os animais com sepse sem tratamento (grupo CLP+sal) apresentaram 75% de sobrevida. Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos, diferentemente do encontrado por Li et al. (2014)¹⁹² e Körner et al. (2018)³⁷⁴. É importante ressaltar a ausência de mortalidade no grupo com sepse e tratado com a associação dos nutracêuticos, tendo em vista que os tratamentos isolados não foram capazes de prevenir a mortalidade, apesar da notável melhora nos parâmetros neuroquímicos.

Considerando os efeitos antioxidantes desempenhados pelo ALA previamente descritos, bem como o papel anti-inflamatório desempenhado pelo OP e reconhecidamente elucidado na literatura; o envolvimento da inflamação e do estresse oxidativo no desenvolvimento da disfunção cerebral associada à sepse; e a ausência de publicações científicas avaliando o sinergismo da associação destes nutracêuticos sobre o SNC de roedores afetados pela sepse, este estudo pode ser considerado inovador. O mecanismo de ação sinérgica entre os dois compostos requer aprofundamento; no entanto, uma das possíveis causas seria a proteção

exercida pelo ALA contra a oxidação do óleo de peixe. Sabe-se que os ácidos graxos encontrados no OP possuem insaturações na cadeia carbônica, o que os predispõem a oxidação por espécies reativas e, conseqüentemente, produção de produtos da peroxidação lipídica³⁷⁵, o que pode contribuir para a mortalidade³⁷⁶. Dados que corroboram esta relação protetora foram demonstrados em um modelo de dieta lipogênica³⁷⁷.

Em conclusão, os achados deste estudo apontam o efeito sinérgico desempenhado pela associação do ácido α -lipoico e do óleo de peixe na diminuição da neuroinflamação e do estresse oxidativo, além do aumento na produção de neurotrofinas e na proteção da capacidade cognitiva em ratos com disfunção cerebral associada à sepse.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo determinar os efeitos isolados e associados dos nutracêuticos ácido α -lipoico e óleo de peixe sobre a mortalidade e parâmetros neuroinflamatórios, neuroquímicos e comportamentais em ratos com disfunção cerebral associada à sepse. Embora a aplicação isolada dos nutracêuticos tenha gerado resultados positivos em estruturas específicas do encéfalo, os achados obtidos permitem concluir que, de uma maneira geral, o tratamento com a associação dos nutracêuticos parece desempenhar papel superior na diminuição da resposta neuroinflamatória e na redução de marcadores de estresse oxidativo, acompanhado do aumento nas concentrações de neurotrofina e prevenção do dano à memória e ao aprendizado em ratos com sepse.

7.1. PERSPECTIVAS FUTURAS

O avanço nas pesquisas científicas acerca da disfunção cerebral associada à sepse é de grande relevância, tendo em vista a dificuldade em estabelecer os mecanismos fisiopatológicos que intermeiam o desenvolvimento da doença, o que reflete na ocorrência de divergências diagnósticas e ineficácia de inúmeras terapias.

Considerando a ausência de pesquisas aplicando tais nutracêuticos na avaliação do SNC de ratos submetidos à sepse, este estudo revelou-se inovador. Tem-se como expectativa que o conhecimento sobre os mecanismos de ação dos nutracêuticos testados possa ser aprofundado. Espera-se, ainda, que os achados atuais possam fornecer dados úteis para a replicação de estudos em outros modelos pré-clínicos e, futuramente, em humanos.

REFERÊNCIAS

1. Vincent JL, Korkut HA. Defining Sepsis. *Clin Chest Med*. 2008;29(4):585–90.
2. Comim CM, Vilela MC, Constantino LS, Petronilho F, Vuolo F, Lacerda-Queiroz N, et al. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. *Intensive Care Med*. 2011;37(4):711–8.
3. Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, et al. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 2005;33(1):221–3.
4. Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, et al. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Med*. 2008;34(9):1724–31.
5. Sankowski R, Mader S, Valdés-Ferrer SI. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2015;9(28):1–20.
6. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, et al. The Surviving Sepsis Campaign: Results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Crit Care Med*. 2010;38(2):367–74.
7. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med*. 2007;35(5):1244–50.
8. ILAS. Campanha Sobrevivendo à Sepse - Relatório Nacional. São Paulo; 2015.
9. Vincent J-L, Marshall JC, Namendys-Silva SA, François B, Martin-Loeches I, Lipman J, et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the Intensive Care Over Nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med*. 2014;2(5):380–6.
10. Messaris E, Memos N, Chatzigianni E, Konstadoulakis MM, Menenakos E, Katsaragakis S, et al. Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death prolongs survival in sepsis. *Crit Care Med*. 2004;32(8):1764–70.
11. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348(2):138–50.

12. Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Rezin GT, et al. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res.* 2011;36(2):304–11.
13. Biff D, Petronilho F, Constantino L, Vuolo F, Zamora-Berridi GJ, Dall'Igna DM, et al. Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. *Shock.* 2013;40(1):45–8.
14. Dal-Pizzol F, Ritter C, Cassol-Jr OJ, Rezin GT, Petronilho F, Zugno AI, et al. Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis. *Neurochem Res.* 2010;35(1):1–12.
15. Gordon SM, Jackson JC, Ely EW, Burger C, Hopkins RO. Clinical identification of cognitive impairment in ICU survivors: insights for intensivists. *Intensive Care Med.* 2004;30(11):1997–2008.
16. Sharshar T, Polito A, Checinski A, Stevens RD. Septic-associated encephalopathy--everything starts at a microlevel. *Crit Care.* 2010;14(5):199.
17. Mazerand A, Pascal Q, Verdonk F, Heming N, Chrétien F, Sharshar T. Neuroanatomy and Physiology of Brain Dysfunction in Sepsis. *Clin Chest Med.* Elsevier Inc; 2016;37(2):333–45.
18. Widmann CN, Heneka MT. Long-term cerebral consequences of sepsis. *Lancet Neurol.* Elsevier Ltd; 2014;13(6):630–6.
19. Granja C, Dias C, Costa-Pereira A, Sarmento A. Quality of life of survivors from severe sepsis and septic shock may be similar to that of others who survive critical illness. *Crit care.* 2004;8(2):R91-8.
20. Aydin A, Halici Z, Akoz A, Karaman A, Ferah I, Bayir Y, et al. Treatment with α -lipoic acid enhances the bone healing after femoral fracture model of rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014;387(11):1025–36.
21. Petronilho F, Florentino D, Danielski LG, Vieira LC, Martins MM, Vieira A, et al. Alpha-lipoic acid attenuates oxidative damage in organs after sepsis. *Inflammation.* 2015;39(1):357–65.
22. Li CC, Yang HT, Hou YC, Chiu YS, Chiu WC. Dietary fish oil reduces systemic inflammation and ameliorates sepsis-induced liver injury by up-regulating the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated pathway in septic mice. *J Nutr Biochem.* 2014;25(1):19–25.
23. Li X, Zhang X, Yang E, Zhang N, Cao S, Zhou Y. Fish oil-supplemented

- parenteral nutrition could alleviate acute lung injury, modulate immunity, and reduce inflammation in rats with abdominal sepsis. *Nutr Res.* 2015;35(9):784–91.
24. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. 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 J.* 1992;101(6):1644–55.
 25. Vincent J. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Crit Care Med.* 1997;25(2):372–4.
 26. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250–6.
 27. Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *Br Med J.* 2007;335(7625):879–83.
 28. Brown T, Ghelani-Allen A, Yeung D, Nguyen HB. Comparative effectiveness of physician diagnosis and guideline definitions in identifying sepsis patients in the emergency department. *J Crit Care.* 2015;30(1):71–7.
 29. Tupchong K, Koyfman A, Foran M. Sepsis, severe sepsis, and septic shock: a review of the literature. *African J Emerg Med.* 2015;5(3):127–35.
 30. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2004;32(3):858–73.
 31. Mendes C, Azevedo L de, Machado F. *Sepse CMIB — Clínicas de Medicina Intensiva Brasileira.* 1st ed. São Paulo: Atheneu; 2014. 272 p.
 32. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *J Am Med Assoc.* 2016;315(8):801–10.
 33. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med.* 2001;29(7 Suppl):S109–16.
 34. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med.* Elsevier Inc; 2013 May;41(5):1167–74.
 35. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR.

- Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29(7):1303–10.
36. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003;348(16):1546–54.
 37. Silva E, Pedro MDA, Sogayar ACB, Mohovic T, Silva CLDO, Janiszewski M, et al. Brazilian sepsis epidemiological study (BASES study). *Crit Care.* 2004;8(4):R251–60.
 38. Sogayar AMC, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CMC, Lobo SMA, et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics.* 2008;26(5):425–34.
 39. Paternoster G, Guarracino F. Sepsis after cardiac surgery: from pathophysiology to management. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2016;30(3):773–80.
 40. László I, Trásy D, Molnár Z, Fazakas J. Sepsis: from pathophysiology to individualized patient care. *J Immunol Res.* 2015;1–13.
 41. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(10):776–87.
 42. Yuki K, Muramaki N. Sepsis pathophysiology and anesthetic consideration. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2015;15(1):57–69.
 43. Spiller S, Elson G, Ferstl R, Dreher S, Mueller T, Freudenberg M, et al. TLR4-induced IFN-gamma production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice. *J Exp Med.* 2008;205(8):1747–54.
 44. Sagy M, Al-Qaqaa Y, Kim P. Definitions and pathophysiology of sepsis. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2013;43(10):260–3.
 45. Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand J Immunol.* 2009;69(6):479–91.
 46. McConnell KW, Coopersmith CM. Pathophysiology of septic shock: From bench to bedside. *Presse Med.* 2016;45(4):e93–8.
 47. Gao H, Leaver SK, Burke-Gaffney A, Finney SJ. Severe sepsis and Toll-like receptors. *Semin Immunopathol.* 2008;30(1):29–40.
 48. Aziz M, Jacob A, Yang W-L, Matsuda A, Wang P. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *J Leukoc Biol.* 2013;93(3):329–42.

49. Lyn-Kew K, Standiford TJ. Immunosuppression in sepsis. *Curr Pharm Des.* 2008;14(19):1870–81.
50. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol.* 2006;177(3):1967–74.
51. Binkowska AM, Michalak G, Slotwinski R. Current views on the mechanisms of immune responses to trauma and infection. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(2):206–16.
52. Huet O, Dupic L, Harrois A, Duranteau J. Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Front Biosci.* 2011;16(1):1986–95.
53. Coletta C, Módis K, Oláh G, Brunyánszki A, Herzig DS, Sherwood ER, et al. Endothelial dysfunction is a potential contributor to multiple organ failure and mortality in aged mice subjected to septic shock: preclinical studies in a murine model of cecal ligation and puncture. *Crit Care.* 2014;18(5):511.
54. Sonnevile R, Verdonk F, Rauturier C, Klein IF, Wolff M, Annane D, et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann Intensive Care.* 2013;3(15):1–11.
55. Siami S, Annane D, Sharshar T. The encephalopathy in sepsis. *Crit Care Clin.* 2008;24(1):67–82.
56. Chen S, Zhang H, Pu H, Wang G, Li W, Leak RK, et al. n-3 PUFA supplementation benefits microglial responses to myelin pathology. *Sci Rep.* 2014;4(7458):1–8.
57. Ji A, Diao H, Wang X, Yang R, Zhang J, Luo W, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids inhibit lipopolysaccharide-induced microglial activation and dopaminergic injury in rats. *Neurotoxicology.* 2012;33(4):780–8.
58. Hjorth E, Freund-Levi Y. Immunomodulation of microglia by docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;15(2):134–43.
59. Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y. Enhanced Expression of Iba1, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia In Rat Brain. *Stroke.* 2001;32:1208–15.
60. Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S, Imai Y. Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma-dependent pathway. *J Biol Chem.*

- 2002;277(22):20026–32.
61. Pettit LK, Varsanyi C, Tadros J, Vassiliou E. Modulating the inflammatory properties of activated microglia with docosahexaenoic acid and aspirin. *Lipids Health Dis.* 2013;12(16):1–14.
 62. Frenkel D, Trudler D, Farfara D. Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: towards future therapeutic application. *Mediators Inflamm.* 2010;1–12.
 63. Handa O, Stephen J, Cepinskas G. Role of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in activation and dysfunction of cerebrovascular endothelial cells during early onsets of sepsis. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2008;295(4):H1712-1719.
 64. Boueiz A, Hassoun PM. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc Res.* 2009;77(1):26–34.
 65. Ouchi Y, Yagi S, Yokokura M, Sakamoto M. Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. *Park Relat Disord.* 2009;15(3 Suppl):S200–4.
 66. Zhang W, Hu X, Yang W, Gao Y, Chen J. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation confers long-term neuroprotection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury through anti-inflammatory actions. *Stroke.* 2010;41(10):2341–7.
 67. Carpentier A, Canney M, Vignot A, Reina V, Beccaria K, Horodyckid C, et al. Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Sci Transl Med.* 2016;8(343):343re2.
 68. Liu Z. Activation of AMPK attenuates lipopolysaccharide-impaired integrity and function of blood-brain barrier in human brain microvascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol.* 2014;97(3):386–92.
 69. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):13–25.
 70. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev.* 2010;64(2):328–63.
 71. Engelhardt B. Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res.* 2003;314(1):119–29.
 72. Akrouf N, Sharshar T, Annane D. Mechanisms of brain signaling during sepsis. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7(4):296–301.

73. Dal-Pizzol F, Rojas HA, Dos Santos EM, Vuolo F, Constantino L, Feier G, et al. Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis. *Mol Neurobiol.* 2013;48(1):62–70.
74. Patel JP, Frey BN. Disruption in the blood-brain barrier: the missing link between brain and body inflammation in bipolar disorder? *Neural Plast.* Hindawi Publishing Corporation; 2015;1–12.
75. Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2003;9(6):540–9.
76. Rodrigues SF, Granger DN. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers.* 2015;3(1–2):1–11.
77. Suzuki Y, Nagai N, Umemura K. A review of the mechanisms of blood-brain barrier permeability by tissue-type plasminogen activator treatment for cerebral ischemia. *Front Cell Neurosci.* 2016;10(2):1–10.
78. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005;57(2):173–85.
79. Zhou T, Zhao L, Zhan R, He Q, Tong Y, Tian X, et al. Blood-brain barrier dysfunction in mice induced by lipopolysaccharide is attenuated by dapsone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;453(3):419–24.
80. Yeh CT, Kao MC, Chen CH, Huang CJ. Platonin preserves blood-brain barrier integrity in septic rats. *Acta Anaesthesiol Taiwanica.* 2015;53(1):12–5.
81. Yang CH, Kao MC, Shih PC, Li KY, Tsai PS, Huang CJ. Simvastatin attenuates sepsis-induced blood-brain barrier integrity loss. *J Surg Res.* 2015;194(2):591–8.
82. Andrades M, Ritter C, De Oliveira MR, Streck EL, Fonseca Moreira JC, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment reverses organ failure in rat model of sepsis: role of antioxidant enzymes imbalance, neutrophil infiltration, and oxidative stress. *J Surg Res.* 2011;167(2):e307-313.
83. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain-barrier. *Nat Med.* 2013;19(12):1584–96.
84. Craciun FL, Schuller ER, Remick DG. Early enhanced local neutrophil recruitment in peritonitis-induced sepsis improves bacterial clearance and survival. *J Immunol.* 2010;185(11):6930–8.
85. Alves-Filho JC, Spiller F, Cunha FQ. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock.*

- 2010;34(1 Suppl):15–21.
86. Kovach M a, Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis.* 2012;25(3):321–7.
 87. Reddy RC, Standiford TJ. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr Opin Hematol.* 2010;17(1):18–24.
 88. Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock.* 2008;30(1 Suppl):3–9.
 89. Kim J, Jeong YH, Lee EJ, Park JS, Seo H, Kim HS. Suppression of neuroinflammation by matrix metalloproteinase-8 inhibitor in aged normal and LRRK2 G2019S Parkinson's disease model mice challenged with lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;493(2):879–86.
 90. Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem.* 2007;101(2):566–76.
 91. Kim YS, Joh TH. Matrix metalloproteinases, new insights into the understanding of neurodegenerative disorders. *Biomol Ther.* 2012;20(2):133–43.
 92. Stolp HB, Dziegielewska KM. Review: Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2009;35(2):132–46.
 93. Geng J, Wang L, Zhang L, Qin C, Song Y, Ma Y, et al. Blood-brain barrier disruption induced cognitive impairment is associated with increase of inflammatory cytokine. *Front Aging Neurosci.* 2018;10(05):1–11.
 94. Cassol-Jr OJ, Comim CM, Constantino LS, Rosa DVF, Mango LA V, Stertz L, et al. Acute low dose of MK-801 prevents memory deficits without altering hippocampal DARPP-32 expression and BDNF levels in sepsis survivor rats. *J Neuroimmunol.* 2011;230(1–2):48–51.
 95. Zagrebelsky M, Korte M. Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses. *Neuropharmacology.* 2014;76(Part C):628–38.
 96. Barichello T, Silva GZ, Generoso JS, Savi GD, Michelon CM, Feier G, et al. Time-dependent behavioral recovery after pneumococcal meningitis in rats. *J Neural Transm.* 2010;117(7):819–26.
 97. Barichello T, Generoso JS, Milioli G, Elias SG, Teixeira AL. Pathophysiology of

- bacterial infection of the central nervous system and its putative role in the pathogenesis of behavioral changes. *Rev Bras Psiquiatr.* 2013;35(1):81–7.
98. Barichello T, Generoso JS, Simões LR, Faller CJ, Ceretta RA, Petronilho F, et al. Sodium butyrate prevents memory impairment by re-establishing BDNF and GDNF expression in experimental pneumococcal meningitis. *Mol Neurobiol.* 2014;52(1):734–40.
 99. Vasconcelos AR, Yshii LM, Viel TA, Buck HS, Mattson MP, Scavone C, et al. Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment. *J Neuroinflammation.* 2014;11(85):1–14.
 100. Schnydrig S, Korner L, Landweer S, Ernst B, Walker G, Otten U, et al. Peripheral lipopolysaccharide administration transiently affects expression of brain-derived neurotrophic factor, corticotropin and proopiomelanocortin in mouse brain. *Neurosci Lett.* 2007;429(1):69–73.
 101. Bossù P, Cutuli D, Palladino I, Caporali P, Angelucci F, Laricchiuta D, et al. A single intraperitoneal injection of endotoxin in rats induces long-lasting modifications in behavior and brain protein levels of TNF- α and IL-18. *J Neuroinflammation.* 2012;9(101):1–12.
 102. Dal-Pizzol F, Tomasi CD, Ritter C. Septic encephalopathy: Does inflammation drive the brain crazy? *Rev Bras Psiquiatr.* 2014;36(3):251–8.
 103. Maramattom BV. Sepsis associated encephalopathy. *Neurol Res.* 2007;29(7):643–6.
 104. Bozza FA, D'Avila JC, Ritter C, Sonnevile R, Sharshar T, Dal-Pizzol F. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. *Shock.* 2013;39(7):10–6.
 105. Semmler A, Widmann CN, Okulla T, Urbach H, Kaiser M, Widman G, et al. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84(1):62–9.
 106. Annane D, Sharshar T. Cognitive decline after sepsis. *Lancet Respir Med.* 2014;3(1):61–9.
 107. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *J Am Med Assoc.* 2010;304(16):1787–94.
 108. Bartsch T, Wulff P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience [Internet]. IBRO;* 2015;309(8):1–16. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.084>
109. Annane D. Hippocampus: A future target for sepsis treatment! *Intensive Care Med.* 2009;35(4):585–6.
 110. Wolff S, Klatt S, Wolff JC, Wilhelm J, Fink L, Kaps M, et al. Endotoxin-induced gene expression differences in the brain and effects of iNOS inhibition and norepinephrine. *Intensive Care Med.* 2009;35(4):730–9.
 111. Nolan Y, Vereker E, Lynch AM, Lynch MA. Evidence that lipopolysaccharide-induced cell death is mediated by accumulation of reactive oxygen species and activation of p38 in rat cortex and hippocampus. *Exp Neurol.* 2003;184(2):794–804.
 112. Park J, Moghaddam B. Impact of anxiety on prefrontal cortex encoding of cognitive flexibility. *Neuroscience.* 2016;1–10.
 113. Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori SS, et al. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Brazilian J Med Biol Res.* 2007;40(6):831–7.
 114. Streck EL, Comim CM, Barichello T, Quevedo J. The septic brain. *Neurochem Res.* 2008;33(11):2171–7.
 115. Ritter C, Tomasi CD, Dal-Pizzol F, Pinto BB, Dyson A, de Miranda AS, et al. Inflammation biomarkers and delirium in critically ill patients. *Crit care.* 2014;18(3):1–6.
 116. Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JCF, Dal-Pizzol F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med.* 2004;32(2):342–9.
 117. Barichello T, Machado RA, Constantino L, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, et al. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit Care Med.* 2007;35(9):2186–90.
 118. Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):271–84.
 119. Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: The role of antioxidant therapy. *Toxicology.* 2003;189(1–2):75–88.
 120. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J*

- Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44–84.
121. Veskokoukis AS, Tsatsakis AM, Kouretas D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones*. 2012;17(1):11–21.
 122. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006;141(2):312–22.
 123. Lushchak VI. Classification of oxidative stress based on its intensity. *EXCLI J*. 2014;13:922–37.
 124. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem*. 2006;97(6):1634–58.
 125. Jensen SJK. Oxidative stress and free radicals. *J Mol Struct THEOCHEM*. 2003;666–667:387–92.
 126. Gülçin I, Beydemir S, Alici HA, Elmastas M, Büyükkuroglu ME. In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacol Res*. 2004;49(1):59–66.
 127. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000;149(1):43–50.
 128. Park S-C, Kim N-H, Yang W, Nah J-W, Jang M-K, Lee D. Polymeric micellar nanoplateforms for Fenton reaction as a new class of antibacterial agents. *J Control Release*. 2016;221:37–47.
 129. Thomas C, Mackey MM, Diaz A a, Cox DP. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: Implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep*. 2009;14(3):102–8.
 130. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1–40.
 131. Adegoke O, Forbes PBC. Challenges and advances in quantum dot fluorescent probes to detect reactive oxygen and nitrogen species: a review. *Anal Chim Acta*. 2015;862(1):1–13.
 132. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review. *J Fluoresc*. 2006;16(1):119–39.
 133. Pitsikas N. The role of nitric oxide in the object recognition memory. *Behav Brain Res*. 2015;285(1):200–7.
 134. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and

- disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):315–424.
135. Barbosa KBF, Costa NMB, De Cássia Gonçalves Alfenas R, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr.* 2010;23(4):629–43.
136. Shami NJIE, Moreira EAM. Lycopene as an antioxidant agent. *Rev Nutr.* 2004;17(2):227–36.
137. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova.* 2006;29(1):113–23.
138. Milagros Rocha M, Victor VM. Targeting antioxidants to mitochondria and cardiovascular diseases: the effects of mitoquinone. *Med Sci Monit.* 2007;13(7):RA132-45.
139. Ye ZW, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2015;1850(8):1607–21.
140. Schneider CD, de Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med do Esporte.* 2004;10(4):308–18.
141. Wu D, Cederbaum AI. Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis.* 2009;29(2):141–54.
142. Victor VM, Rocha M. Targeting antioxidants to mitochondria: a potential new therapeutic strategy for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des.* 2007;13(8):845–63.
143. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide Dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1583–606.
144. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(3):337–49.
145. Prakash PA, Yogeswaran U, Chen SM. A review on direct electrochemistry of catalase for electrochemical sensors. *Sensors.* 2009;9(3):1821–44.
146. Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Zák A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Czech Republic).* 2014;60(4):153–67.

147. Bekdeşer B, Özyürek M, Güçlü K, Alkan FÜ, Apak R. Development of a new catalase activity assay for biological samples using optical CUPRAC sensor. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2014;132:485–90.
148. Fallah S, Valinejad Sani F, Firoozrai M. Effect of contraceptive pills on the activity status of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase and superoxide dismutase in healthy subjects. *Contraception.* 2011;83(4):385–9.
149. Xiao BH, Shi M, Chen H, Cui S, Wu Y, Gao XH, et al. Glutathione peroxidase level in patients with vitiligo: a meta-analysis. *Biomed Res Int.* 2016;2016(1–11).
150. Chen X, Scholl TO, Leskiw MJ, Donaldson MR, Stein TP, Gynecology XC, et al. Association of glutathione peroxidase activity with normal pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(12):5963–8.
151. El-Far MA, Bakr MA, Farahat SE, Abd El-Fattah EA. Glutathione peroxidase activity in patients with renal disorders. *Clin Exp Nephrol.* 2005;9(2):127–31.
152. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014;224(1):164–75.
153. Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol.* 2011;101(1):13–30.
154. Rhoads DM. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol.* 2006;141(2):357–66.
155. Andrades ME, Ritter C, Dal-Pizzol F. The role of free radicals in sepsis development. *Front Biosci.* 2009;1(1):277–87.
156. Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JCF, et al. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* 2006;34(3):886–9.
157. Ritter C, Andrades M, Frota MLC, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med.* 2003;29(10):1782–9.
158. Andrades M, Ritter C, Moreira JCF, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. *J Surg Res.* 2005;125(1):68–72.
159. Angus DC, Musthafa AA, Clermont G, Griffin MF, Linde-Zwirble WT, Dremsizov TT, et al. Quality-adjusted survival in the first year after the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(6):1389–94.

160. Morin EE, Guo L, Schwendeman A, Li XA. HDL in sepsis - risk factor and therapeutic approach. *Front Pharmacol*. 2015;6(10):1–9.
161. Van der Poll T. Future of sepsis therapies. *Crit Care*. 2016;20(1):106.
162. Lolis E, Bucala R. Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(8):635–45.
163. Rivers EP, McIntyre L, Morro DC, Rivers KK. Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taking advantage of a window of opportunity. *CMAJ*. 2005;173(9):1054–65.
164. Carvalho PRA, Trotta E de A. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. *J Pediatr (Rio J)*. 2003;79(2 Suppl):195–204.
165. Kalra EK. Nutraceutical--definition and introduction. *AAPS PharmSci*. 2003;5(3):E25.
166. González-Sarrías A, Larrosa M, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Nutraceuticals for older people: facts, fictions and gaps in knowledge. *Maturitas*. 2013;75(4):313–34.
167. Kates S a, Casale R a, Baguisi A, Beeuwkes R. Lipoic acid analogs with enhanced pharmacological activity. *Bioorg Med Chem*. 2014;22(1):505–12.
168. Mahboob A, Farhat SM, Iqbal G, Babar MM, Zaidi N us SS, Nabavi SM, et al. Alpha-lipoic acid-mediated activation of muscarinic receptors improves hippocampus- and amygdala-dependent memory. *Brain Res Bull*. 2016;122(1):19–28.
169. Henriksen EJ, Saengsirisuwan V. Exercise training and antioxidants: relief from oxidative stress and insulin resistance. *Exerc Sport Sci Rev*. 2003;31(2):79–84.
170. Çakatay U. Should it be safer to use a redox couple, both with (R)-alpha-lipoic acid combined with (R)-dihydrolipoic acid for avoiding prooxidant action of alpha-lipoic acid? *Med Hypotheses*. 2007;68(5):1178.
171. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(10):1149–60.
172. Hermann R, Niebch G, Borbe HO, Fieger-Büschges H, Ruus P, Nowak H, et al. Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic α -lipoic acid formulations in healthy volunteers. *Eur J Pharm Sci*. 1996;4(3):167–74.
173. Çakatay U. Pro-oxidant actions of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med*

- Hypotheses. 2006;66(1):110–7.
174. Teichert J, Hermann R, Ruus P, Preiss R. Plasma kinetics, metabolism, and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. England; 2003 Nov;43(11):1257–67.
 175. Abadi A, Crane JD, Ogborn D, Hettinga B, Akhtar M, Stokl A, et al. Supplementation with α -lipoic acid, CoQ10, and vitamin E augments running performance and mitochondrial function in female mice. *PLoS One*. 2013;8(4):1–12.
 176. Sharma M, Gupta YK. Effect of alpha lipoic acid on intracerebroventricular streptozotocin model of cognitive impairment in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2003;13(4):241–7.
 177. Hiller S, DeKroon R, Hamlett ED, Xu L, Osorio C, Robinette J, et al. Alpha-lipoic acid supplementation protects enzymes from damage by nitrosative and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2016;1860(1):36–45.
 178. Seifar F, Khalili M, Khaledyan H, Amiri Moghadam S, Izadi A, Azimi A, et al. α -Lipoic acid, functional fatty acid, as a novel therapeutic alternative for central nervous system diseases: A review. *Nutr Neurosci*. 2017;0(0):1–11.
 179. Takechi R, Pallegage-Gamarallage MM, Lam V, Giles C, Mamo JC. Nutraceutical agents with anti-inflammatory properties prevent dietary saturated-fat induced disturbances in blood-brain barrier function in wild-type mice. *J Neuroinflammation*. 2013;10(1):73.
 180. Ahmadi A, Mazooji N. Effect of alpha-lipoic acid and vitamin E supplementation on oxidative stress, inflammation, and malnutrition in hemodialysis patients. *Iran J Kidney Dis*. 2013;7(6):461–7.
 181. Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Attia HA, Hasan IH, Al-Amin M, Al-Ajmi H, et al. Adverse cardiac responses to alpha-lipoic acid in a rat-diabetic model: Possible mechanisms? *J Physiol Biochem*. 2013;69(4):761–78.
 182. Castro MC, Massa ML, Schinella G, Gagliardino JJ, Francini F. Lipoic acid prevents liver metabolic changes induced by administration of a fructose-rich diet. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2013;1830(1):2226–32.
 183. Chng HT, New LS, Neo AH, Goh CW, Browne ER, Chan ECY. A sensitive LC/MS/MS bioanalysis assay of orally administered lipoic acid in rat blood and brain tissue. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;51(3):754–7.
 184. Toklu HZ, Hakan T, Biber N, Solakoglu S, Ogunc AV, Sener G. The protective

- effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. *Free Radic Res.* 2009;43(7):658–67.
185. Maczurek A, Hager K, Kenklies M, Sharman M, Martins R, Engel J, et al. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(13–14):1463–70.
 186. Rocamonde B, Paradells S, Barcia C, Garcia Esparza A, Soria JM. Lipoic acid treatment after brain injury: Study of the glial reaction. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013.
 187. Rocamonde B, Paradells S, Barcia JM, Barcia C, Garc??a Verdugo JM, Miranda M, et al. Neuroprotection of lipoic acid treatment promotes angiogenesis and reduces the glial scar formation after brain injury. *Neuroscience.* 2012;224(1):102–15.
 188. Schreibelt G, Musters RJP, Reijkerkerk A, de Groot LR, van der Pol SMA, Hendriks EML, et al. Lipoic acid affects cellular migration into the central nervous system and stabilizes blood-brain barrier integrity. *J Immunol.* 2006;177(4):2630–7.
 189. Chng HT, New LS, Neo AH, Goh CW, Browne ER, Chan ECY. Distribution study of orally administered lipoic acid in rat brain tissues. *Brain Res.* 2009;1251(1):80–6.
 190. Quinn JF, Bussiere JR, Hammond RS, Montine TJ, Henson E, Jones RE, et al. Chronic dietary α -lipoic acid reduces deficits in hippocampal memory of aged Tg2576 mice. *Neurobiol Aging.* 2007;28(2):213–25.
 191. Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, et al. The antioxidants α -lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J Neurochem.* 2003;84(5):1173–83.
 192. Li G, Gao L, Jia J, Gong X, Zang B, Chen W. α -Lipoic acid prolongs survival and attenuates acute kidney injury in a rat model of sepsis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2014;41(7):459–68.
 193. Vanasco V, Cimolai MC, Evelson P, Alvarez S. The oxidative stress and the mitochondrial dysfunction caused by endotoxemia are prevented by α -lipoic acid. *Free Radic Res.* 2008;42(9):815–23.
 194. Goręca A, Aslanowicz-Antkowiak K. Prophylaxis with α -lipoic acid against lipopolysaccharide-induced brain injury in rats. *Arch Immunol Ther Exp*

- (Warsz). 2009;57(2):141–6.
195. Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: Nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol*. 2013;75(3):645–62.
 196. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1851(4):469–84.
 197. Eltweri AM, Thomas AL, Metcalfe M, Calder PC, Dennison AR, Bowrey DJ. Potential applications of fish oils rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of gastrointestinal cancer. *Clin Nutr [Internet]*. 2016;1–14. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561416000091>
 198. Calder PCP. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr*. 2012;142(3):592S–9S.
 199. Allam-Ndoul B, Guénard F, Barbier O, Vohl M-C. Effect of n-3 fatty acids on the expression of inflammatory genes in THP-1 macrophages. *Lipids Health Dis*. 2016;15(69):1–7.
 200. Arterburn L, Hall E, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(6 Suppl):1467S–76S.
 201. Santos ELS, Bortolozo EAFQ. Ingestão de ômega 3: considerações sobre potenciais benefícios no metabolismo lipídico. *Publ UEPG Ci Exatas Terra*. 2008;14(2):161–70.
 202. Yates CM, Calder PC, Ed Rainger G. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol Ther*. 2014;141(3):272–82.
 203. Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak J. PUFAs: structures, metabolism and functions. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24(6):931–41.
 204. Ruxton CHS, Reed SC, Simpson MJA, Millington KJ. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet*. 2004;17(5):449–59.
 205. Lee J, Lee H, Kang S, Park W. Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*. 2016;8(1):23.
 206. Ruiz-López N, Sayanova O, Napier JA, Haslam RP. Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants. *J Exp Bot*. 2012;63(7):2397–410.
 207. Huang YS, Pereira SL, Leonard AE. Enzymes for transgenic biosynthesis of

- long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biochimie*. 2004;86(11):793–8.
208. Jump DB. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*. 2002;277(11):8755–8.
209. Song C, Shieh C, Wu Y, Kalueff A, Gaikwad S, Su K. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the treatment of major depression and Alzheimer's disease: acting separately or synergistically? *Prog Lipid Res*. 2016;62(1):41–54.
210. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*. 2009;91(6):791–5.
211. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2006;75(3):197–202.
212. Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther*. 2006;110(3):371–85.
213. Im DS. Omega-3 fatty acids in anti-inflammation (pro-resolution) and GPCRs. *Prog Lipid Res*. 2012;51(3):232–7.
214. Chee B, Park B, Fitzsimmons T, Coates AM, Bartold PM. Omega-3 fatty acids as an adjunct for periodontal therapy—a review. *Clin Oral Investig*. 2016;
215. Serhan CN. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation. *Am J Pathol*. 2010;177(4):1576–91.
216. Zhu H, Fan C, Xu F, Tian C, Zhang F, Qi K. Dietary fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids and alpha-linolenic acid differently affect brain accretion of docosahexaenoic acid and expression of desaturases and sterol regulatory element-binding protein 1 in mice. *J Nutr Biochem*. 2010;21(10):954–60.
217. Dyall SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci*. 2015;7(4):1–15.
218. Shih JM, Shih YM, Pai MH, Hou YC, Yeh CL, Yeh SL. Fish oil-based fat emulsion reduces acute kidney injury and inflammatory response in antibiotic-treated polymicrobial septic mice. *Nutrients*. 2016;8(3).
219. Tian T, Zhao Y, Huang Q, Li J. N-3 polyunsaturated fatty acids improve inflammation via inhibiting sphingosine kinase 1 in a rat model of parenteral nutrition and CLP-induced sepsis. *Lipids*. 2016;51(3):271–8.
220. Lanza-Jacoby S, Phetteplace H, Tripp R. Enteral feeding a structured lipid emulsion containing fish oil prevents the fatty liver of sepsis. *Lipids*.

- 1995;30(8):707–12.
221. Hall TC, Bilku DK, Al-Leswas D, Neal CP, Horst C, Cooke J, et al. A randomized controlled trial investigating the effects of parenteral fish oil on survival outcomes in critically ill patients with sepsis: a pilot study. *J Parenter Enter Nutr.* 2015;39(3):301–12.
 222. Lakshmikanth CL, Jacob SP, Chaithra VH, de Castro-Faria-Neto HC, Marathe GK. Sepsis: in search of cure. *Inflamm Res.* 2016;
 223. Volpe BT, Berlin RA, Frankfurt M. The brain at risk: the sepsis syndrome and lessons from preclinical experiments. *Immunol Res.* 2015;63(1–3):70–4.
 224. Nemzek JA, Hugunin KMS, Opp MR. Modeling sepsis in the laboratory: Merging sound science with animal well-being. *Comp Med.* 2008;58(2):120–8.
 225. Buras J a, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(10):854–65.
 226. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):137–43.
 227. Traeger T, Koerner P, Kessler W, Cziupka K, Diedrich S, Busemann A, et al. Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J Vis Exp.* 2010;(46):1–5.
 228. Toscano MG, Ganea D, Gamero AM. Cecal ligation puncture procedure. *J Vis Exp.* 2011;(51):1–5.
 229. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol.* 2011;19(4):198–208.
 230. Siempos II, Lam HC, Ding Y, Choi ME, Choi AMK, Ryter SW. Cecal ligation and puncture-induced sepsis as a model to study autophagy in mice. *J Vis Exp.* 2014;(84):1–7.
 231. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980;29(2):189–201.
 232. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, Bland KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock.* 2005;24(1 Suppl):52–7.
 233. Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med.* 2009;37(1 Suppl):S30–7.
 234. Lian H, Roy E, Zheng H. Protocol for primary microglial culture preparation. *Bio-Protocol.* 2016;6(21):1–10.

235. Bronstein R, Torres L, Nissen JC, Tsirka SE. Culturing microglia from the neonatal and adult central nervous system. *J Vis Exp.* 2013;(78):1–6.
236. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res.* 1990;49(2):186–96.
237. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc. England;* 2009;4(1):31–6.
238. Park SY, Jin ML, Ko MJ, Park G, Choi YW. Anti-neuroinflammatory effect of emodin in LPS-stimulated microglia: involvement of AMPK/Nrf2 activation. *Neurochem Res.* 2016;41(11):2981–92.
239. Scumpia PO, Kelly-Scumpia K, Stevens BR. Alpha-lipoic acid effects on brain glial functions accompanying double-stranded RNA antiviral and inflammatory signaling. *Neurochem Int. Elsevier Ltd;* 2014;64(1):55–63.
240. Razzak A, Aldrich C, Babcock TA, Saied A, Espat NJ. Attenuation of iNOS in an LPS-stimulated macrophage model by omega-3 fatty acids is independent of COX-2 derived PGE2. *J Surg Res.* 2008;145(2):244–50.
241. Alwayn IPJ, Gura K, Nosé V, Zausche B, Javid P, Garza J, et al. Omega-3 fatty acid supplementation prevents hepatic steatosis in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatr Res.* 2005;57(3):445–52.
242. Carvalho D, Petronilho F, Vuolo F, Machado RA, Constantino L, Guerrini R, et al. The nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Intensive Care Med.* 2008;34(12):2284–90.
243. George A, Schmidt C, Weishaupt A, Toyka K V, Sommer C. Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. *Exp Neurol.* 1999;160(1):124–32.
244. Amanzada A, Malik IA, Nischwitz M, Sultan S, Naz N, Ramadori G. Myeloperoxidase and elastase are only expressed by neutrophils in normal and in inflamed liver. *Histochem Cell Biol.* 2011;135(3):305–15.
245. De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions.* 1989;26(3–4):335–41.
246. Uyama O, Okamura N, Yanase M, Narita M, Kawabata K, Sugita M. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after

- transient ischemia using Evans blue fluorescence. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988;8(2):282–4.
247. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131–8.
248. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421–31.
249. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464–78.
250. Bannister J V, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987;32:279–312.
251. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121–6.
252. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265–75.
253. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1):248–54.
254. Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, et al. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 2000;7(5):333–40.
255. de Lima MNM, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schroder N. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp Gerontol.* 2005;40(6):506–11.
256. Cadirci E, Altunkaynak BZ, Halici Z, Odabasoglu F, Uyanik MH, Gundogdu C, et al. Alpha-lipoic acid as a potential target for the treatment of lung injury caused by cecal ligation and puncture-induced sepsis model in rats. *Shock. United States;* 2010 May;33(5):479–84.
257. Okamoto H, Ito O, Roman RJ, Hudetz AG. Role of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase- 2 in endotoxin-induced cerebral hyperemia. *Stroke.* 1998;29(6):1209–18.
258. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong J-S, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia.* 2007;55(5):453–62.

259. Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, et al. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol*. 2007;204(2):733–40.
260. Taccone FS, Castanares-Zapatero D, Peres-Bota D, Vincent J-L, Berre' J, Melot C. Cerebral autoregulation is influenced by carbon dioxide levels in patients with septic shock. *Neurocrit Care*. 2010;12(1):35–42.
261. Michels M, Danieslki LG, Vieira A, Florentino D, Dall'Igna D, Galant L, et al. CD40–CD40 ligand pathway is a major component of acute neuroinflammation and contributes to long-term cognitive dysfunction after sepsis. *Mol Med*. 2015;21(1):219–26.
262. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, et al. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*. United States; 1997 Sep;46(9):1481–90.
263. Wong A, Dukic-Stefanovic S, Gasic-Milenkovic J, Schinzel R, Wiesinger H, Riederer P, et al. Anti-inflammatory antioxidants attenuate the expression of inducible nitric oxide synthase mediated by advanced glycation endproducts in murine microglia. *Eur J Neurosci*. France; 2001 Dec;14(12):1961–7.
264. Zhang W-J, Wei H, Hagen T, Frei B. α -lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(10):4077–82.
265. Di Stefano A, Sozio P, Cerasa LS, Iannitelli A, Cataldi A, Zara S, et al. Ibuprofen and lipoic acid diamide as co-drug with neuroprotective activity: pharmacological properties and effects in beta-amyloid (1-40) infused Alzheimer's disease rat model. *Int J Immunopathol Pharmacol*. England; 2010;23(2):589–99.
266. Smith AR, Shenvi S V, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2004;11(9):1135–46.
267. Manda-Handzlik A, Demkow U. Neutrophils: the role of oxidative and nitrosative stress in health and disease. *Adv Exp Med Biol*. 2015;857:51–60.
268. Lobo SM, Soriano FG, Barbeiro DF, De Backer D, Sun Q, Tu Z, et al. Effects of dobutamine on gut mucosal nitric oxide production during endotoxic shock in

- rabbits. *Med Sci Monit. United States*; 2009 Feb;15(2):BR37-42.
269. Berg RMG, Møller K, Bailey DM. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(7):1532–44.
270. Pacher P, Szabo C. Role of the peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human disease. *Am J Pathol. United States*; 2008 Jul;173(1):2–13.
271. Soriano FG, Nogueira AC, Caldini EG, Lins MH, Teixeira AC, Cappi SB, et al. Potential role of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of myocardial contractile dysfunction associated with human septic shock. *Crit Care Med. United States*; 2006 Apr;34(4):1073–9.
272. Santiago APSA, Chaves EA, Oliveira MF, Galina A. Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: Correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie.* 2008;90(10):1566–77.
273. Guo Q, Tirosh O, Packer L. Inhibitory effect of alpha-lipoic acid and its positively charged amide analogue on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2001;61(5):547–54.
274. Demarco VG, Scumpia PO, Bosanquet JP, Skimming JW. Alpha-lipoic acid inhibits endotoxin-stimulated expression of iNOS and nitric oxide independent of the heat shock response in RAW 264.7 cells. *Free Radic Res.* 2004;38(7):675–82.
275. Shen H-H, Lam K-K, Cheng P-Y, Kung C-W, Chen S-Y, Lin P-C, et al. Alpha-lipoic acid prevents endotoxic shock and multiple organ dysfunction syndrome induced by endotoxemia in rats. *Shock.* 2015;43(4):405–11.
276. Koriyama Y, Nakayama Y, Matsugo S, Sugitani K, Ogai K, Takadera T, et al. Anti-inflammatory effects of lipoic acid through inhibition of GSK-3beta in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglial cells. *Neurosci Res.* 2013;77(1–2):87–96.
277. Arivazhagan P, Shila S, Kumaran S, Panneerselvam C. Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in various brain regions of aged rats. *Exp Gerontol.* 2002;37(6):803–11.
278. Çakatay U, Kayali R. Plasma protein oxidation in aging rats after alpha-lipoic acid administration. *Biogerontology.* 2005;6(2):87–93.
279. Yan LJ, Traber MG, Kobuchi H, Matsugo S, Tritschler HJ, Packer L. Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation.

- Arch Biochem Biophys. 1996;327(2):330–4.
280. Abdou RH, Abdel-Daim MM. Alpha-lipoic acid improves acute deltamethrin-induced toxicity in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2014;92(9):773–9.
281. Castro MC, Francini F, Gagliardino JJ, Massa ML. Lipoic acid prevents fructose-induced changes in liver carbohydrate metabolism: role of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(3):1145–51.
282. Xiao Y, Cui J, Shi Y, Le G. Alpha-lipoic acid protects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J Funct Foods*. 2012;4(3):642–9.
283. Boyaci MG, Eser O, Kocogullari CU, Karavelioglu E, Tokyol C, Can Y. Neuroprotective effect of alpha-lipoic acid and methylprednisolone on the spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Br J Neurosurg*. 2015;29(1):46–51.
284. Dalazen GR, Terra M, Jacques CED, Coelho JG, Freitas R, Mazzola PN, et al. Pipecolic acid induces oxidative stress in vitro in cerebral cortex of young rats and the protective role of lipoic acid. *Metab Brain Dis*. 2014;29(1):175–83.
285. Jalali-Nadoushan M, Roghani M. Alpha-lipoic acid protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in a rat model of hemi-parkinsonism. *Brain Res*. 2013;1505:68–74.
286. Goraca A, Jozefowicz-Okonkwo G. Protective effects of early treatment with lipoic acid in LPS-induced lung injury in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2007;58(3):541–9.
287. Goraca A, Skibska B. Beneficial effect of alpha-lipoic acid on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in bronchoalveolar lavage fluid. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59(2):379–86.
288. Goraca A, Piechota A, Huk-Kolega H. Effect of alpha-lipoic acid on LPS-induced oxidative stress in the heart. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60(1):61–8.
289. Constantino L, Gonçalves RC, Giombelli VR, Tomasi CD, Vuolo F, Kist LW, et al. Regulation of lung oxidative damage by endogenous superoxide dismutase in sepsis. *Intensive Care Med Exp*. 2014;2(1):17.
290. Alvarez B, Demicheli V, Duran R, Trujillo M, Cervenansky C, Freeman BA, et al. Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidiny radical. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(6):813–22.
291. Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori

- SS, et al. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Brazilian J Med Biol Res.* 2007;40:831–7.
292. Michels M, Steckert A V, Quevedo J, Barichello T, Dal-pizzol F. Mechanisms of long-term cognitive dysfunction of sepsis : from blood-borne leukocytes to glial cells. *Intensive Care Med Exp.* 2015;3(30):1–13.
293. Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, et al. Memory-enhancing treatments reverse the impairment of inhibitory avoidance retention in sepsis-surviving rats. *Crit Care.* 2008;12(5):R133.
294. Petronilho F, Périco SR, Vuolo F, Mina F, Constantino L, Comim CM, et al. Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. *Brain Behav Immun.* 2012;26(6):904–10.
295. Cassol-Jr OJ, Comim CM, Silva BR, Hermani F V, Constantino LS, Felisberto F, et al. Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *Brain Res.* 2010;1348(1):128–38.
296. Martínez-levy GA, Cruz-fuentes CS. Genetic and epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system. *Yale J Biol Med.* 2014;87(1):173–86.
297. Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther.* 2013;138(2):155–75.
298. Mitre M, Mariga A, Chao M V. Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci.* 2017;131(1):13–23.
299. Deogracias R, Espliguero G, Iglesias T, Rodríguez-Peña A. Expression of the neurotrophin receptor trkB is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2004;26(3):470–80.
300. Venkatesan R, Ji E, Kim SY. Phytochemicals that regulate neurodegenerative disease by targeting neurotrophins: A comprehensive review. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
301. Spencer JPE, Vauzour D, Rendeiro C. Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Arch Biochem Biophys.* 2009;492(1–2):1–9.
302. Finkbeiner S. CREB Couples Neurotrophin Signals to Survival Messages. *Neuron.* 2000;25(1):11–4.

303. Pugazhenth S, Phansalkar K, Audesirk G, West A, Cabell L. Differential regulation of c-jun and CREB by acrolein and 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(1):21–34.
304. Wu A, Ying ZHE, Gomez-pinilla F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2004;21(10):1457–67.
305. Zou J, Crews F. CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26(4–6):385–405.
306. Morzelle MC, Salgado JM, Telles M, Mourelle D, Bachiega P, Buck HS, et al. Neuroprotective effects of pomegranate peel extract after chronic infusion with amyloid- β peptide in mice. *PLoS One.* 2016;11(11):1–20.
307. Barichello T, Generoso JS, Simões LR, Steckert A V., Moreira AP, Domingui D, et al. Folic acid prevented cognitive impairment in experimental pneumococcal meningitis. *J Neural Transm.* 2015;122(5):643–51.
308. Suzukawa K, Miura K, Mitsushita J, Resau J, Hirose K, Crystal R, et al. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2000;275(18):13175–8.
309. Bedogni B, Pani G, Colavitti R, Riccio A, Borrello S, Murphy M, et al. Redox regulation of cAMP-responsive element-binding protein and induction of manganous superoxide dismutase in nerve growth factor-dependent cell survival. *J Biol Chem.* 2003;278(19):16510–9.
310. Erbaş O, Taşkıran D. Sepsis-induced changes in behavioral stereotypy in rats; Involvement of tumor necrosis factor-alpha, oxidative stress, and dopamine turnover. *J Surg Res.* 2014;186(1):262–8.
311. Zampieri FG, Park IIM, Fabio III, Machado S, Luciano III, Pontes C. Sepsis-associated encephalopathy : not just delirium. *Clinics.* 2011;66(10):1825–31.
312. Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D. Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Med.* 2007;33(6):941–50.
313. Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release.* 2016;235:34–47.
314. Michels M, Danieslki LG, Vieira A, Florentino D, Dall'Igna D, Galant L, et al. CD40-CD40 Ligand Pathway is a Major Component of Acute

- Neuroinflammation and Contributes to Long-term Cognitive Dysfunction after Sepsis. *Mol Med*. 2015;21(1):219–26.
315. Danielski LG, Giustina A Della, Goldim MP, Florentino D, Mathias K, Garbossa L, et al. Vitamin B6 reduces neurochemical and long-term cognitive alterations after polymicrobial sepsis: involvement of the kynurenine pathway modulation. *Mol Neurobiol*. 2017;1–14.
 316. Della Giustina A, Goldim MP, Danielski LG, Florentino D, Mathias K, Garbossa L, et al. Alpha-lipoic acid attenuates acute neuroinflammation and long-term cognitive impairment after polymicrobial sepsis. *Neurochem Int*. 2017;108:436–47.
 317. Weitzberg E, Hezel M, Lundberg JO. Nitrate-nitrite-nitric oxide pathway: Implications for anesthesiology and intensive care. *Anesthesiology*. 2010;113(6):1460–75.
 318. Giustina A Della, Bonfante S, Zarbato GF, Danielski LG, Mathias K, de Oliveira AN, et al. Dimethyl Fumarate Modulates Oxidative Stress and Inflammation in Organs After Sepsis in Rats. *Inflammation*. *Inflammation*; 2017;1–13.
 319. van de Veerdonk FL, Netea MG. New insights in the immunobiology of IL-1 family members. *Front Immunol*. 2013;4(JUL):1–11.
 320. Gray SM, Bloch MH. Systematic review of proinflammatory cytokines in obsessive-compulsive disorder. *Curr Psychiatry Rep*. 2012;14(3):220–8.
 321. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, McGuire F, Nagarkatti PS, et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo (Brooklyn)*. 2013;27(6):669–84.
 322. Wu H-P, Chen C-K, Chung K, Tseng J-C, Hua C-C, Liu Y-C, et al. Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. *Inflamm Res*. 2009;58(7):385–93.
 323. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*. 2000;181(1):176–80.
 324. Steckert AV, Castro AA de, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Sepsis in the central nervous system and antioxidant strategies with N-acetylcysteine, vitamins, and statins. *Curr Neurovasc Res*. 2014;11(1):83–90.
 325. Calder PC. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(May 2005):1505–19.

326. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):349–61.
327. Andrades M, Ritter C, De Oliveira MR, Streck EL, Fonseca Moreira JC, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment reverses organ failure in rat model of sepsis: Role of antioxidant enzymes imbalance, neutrophil infiltration, and oxidative stress. *J Surg Res.* 2011;167(2).
328. Jangale NM, Devarshi PP, Dubal AA, Ghule AE, Koppikar SJ, Bodhankar SL, et al. Dietary flaxseed oil and fish oil modulates expression of antioxidant and inflammatory genes with alleviation of protein glycation status and inflammation in liver of streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Food Chem.* 2013;141(1):187–95.
329. Zanatta AL, Miranda DTSZ, Dias BCL, Campos RM, Massaro MC, Michelotto P V., et al. Fish oil supplementation decreases oxidative stress but does not affect platelet-activating factor bioactivity in lungs of asthmatic rats. *Lipids.* 2014;49(7):665–75.
330. Iraz M, Erdogan H, Ozyurt B, Ozugurlu F, Ozgocmen S, Fadillioglu E. Brief Communication : Omega-3 Essential Fatty Acid Supplementation and Erythrocyte Oxidant / Antioxidant Status in Rats. 2005;35(2):169–73.
331. Wang HH, Hung TM, Wei J, Chiang AN. Fish oil increases antioxidant enzyme activities in macrophages and reduces atherosclerotic lesions in apoE-knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2004;61(1):169–76.
332. Schmidt S, Stahl F, Mutz K-O, Scheper T, Hahn A, Schuchardt JP. Transcriptome-based identification of antioxidative gene expression after fish oil supplementation in normo- and dyslipidemic men. *Nutr Metab (Lond).* 2012;9(1):45.
333. Anderson EJ, Thayne KA, Harris M, Shaikh SR, Darden TM, Lark DS, et al. Do fish oil omega-3 fatty acids enhance antioxidant capacity and mitochondrial fatty acid oxidation in human atrial myocardium via PPAR γ activation? *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(8):1156–63.
334. Wan Y, Xu J, Ma D, Zeng Y, Cibelli M, Maze M. Postoperative impairment of cognitive function in rats: a possible role for cytokine-mediated inflammation in the hippocampus. *Anesthesiology.* 2007;106(3):436–43.
335. Zhao CH, Liu HQ, Cao R, Ji AL, Zhang L, Wang F, et al. Effects of dietary fish

- oil on learning function and apoptosis of hippocampal pyramidal neurons in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res.* 2012;1457:33–43.
336. Jia D, Heng LJ, Yang RH, Gao GD. Fish oil improves learning impairments of diabetic rats by blocking PI3K/AKT/nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways. *Neuroscience.* 2014;258:228–37.
337. Bacarin CC, Mori MA, Dias Fiuza Ferreira E, Valério Romanini C, Weffort de Oliveira RM, Milani H. Fish oil provides robust and sustained memory recovery after cerebral ischemia: Influence of treatment regimen. *Physiol Behav.* 2013;119:61–71.
338. Staziaki P V, Marques CM, Delattre AM, de Paula Cioni B, Rufino M, Dos Santos FV, et al. Fish oil has beneficial effects on behavior impairment and oxidative stress in rats subjected to a hepatic encephalopathy model. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2013;12(1):84–93.
339. Lipsky RH, Marini AM. Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1122:130–43.
340. Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LC, Petronilho F, Constantino LS, Stertz L, et al. Depressive-like parameters in sepsis survivor rats. *Neurotox Res.* 2010;17(3):279–86.
341. Blondeau N, Nguemeni C, Debruyne DN, Piens M, Wu X, Pan H, et al. Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: A versatile potential therapy for stroke. *Neuropsychopharmacology.* 2009;34(12):2548–59.
342. Pudell C, Vicente BA, Delattre AM, Carabelli B, Mori MA, Suchecki D, et al. Fish oil improves anxiety-like, depressive-like and cognitive behaviors in olfactory bulbectomised rats. *Eur J Neurosci.* 2014;39(2):266–74.
343. Zugno AI, Canever L, Chipindo H, Mastella G, Heylmann AS, Oliveira MB, et al. Effects of omega-3 supplementation on interleukin and neurotrophin levels in an animal model of schizophrenia. *An Acad Bras Cienc.* 2015;87(2):1475–86.
344. Goldstein BI, Collinger KA, Lotrich F, Marsland AL, Gill M-K, Axelson DA, et al. Preliminary findings regarding proinflammatory markers and brain-derived neurotrophic factor among adolescents with bipolar spectrum disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2011;21(5):479–84.
345. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult

- hippocampal neurogenesis. *Science* (80-). 2003;302(5651):1760–5.
346. Venna VR, Deplanque D, Allet C, Belarbi K, Hamdane M, Bordet R. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(2):199–211.
347. Ferraz AC, Delattre AM, Almendra RG, Sonagli M, Borges C, Araujo P, et al. Chronic ω -3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. *Behav Brain Res*. 2011;219(1):116–22.
348. Zhang J, Yao W, Hashimoto K. Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-TrkB signaling in inflammation-related depression and potential therapeutic targets. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(7):721–31.
349. Bhatia HS, Agrawal R, Sharma S, Huo YX, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Omega-3 fatty acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood. *PLoS One*. 2011;6(12).
350. 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(S10):S331–6.
351. Bozza FA, D'Avila JC, Ritter C, Sonnevile R, Sharshar T, Dal-Pizzol F. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. *Shock*. 2013;39(Suppl 1):10–6.
352. Sharshar T, Bozza F, Chrétien F. Neuropathological processes in sepsis. *Lancet Neurol*. 2014;13(6):534–6.
353. Kim Y-K, Na K-S, Myint A-M, Leonard BE. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2016;64(1):277–84.
354. Plaschke K, Fichtenkamm P, Schramm C, Hauth S, Martin E, Verch M, et al. Early postoperative delirium after open-heart cardiac surgery is associated with decreased bispectral EEG and increased cortisol and interleukin-6. *Intensive Care Med*. 2010;36(12):2081–9.
355. Katsumata Y, Harigai M, Kawaguchi Y, Fukasawa C, Soejima M, Takagi K, et al. Diagnostic reliability of cerebral spinal fluid tests for acute confusional state (delirium) in patients with systemic lupus erythematosus: interleukin 6 (IL-6), IL-

- 8, interferon-alpha, IgG index, and Q-albumin. *J Rheumatol*. 2007;34(10):2010–7.
356. Sun J, Zhang S, Zhang X, Zhang X, Dong H, Qian Y. IL-17A is implicated in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and cognitive impairment in aged rats via microglial activation. *J Neuroinflammation*. 2015;12:165.
357. Perry VH. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: Implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun*. 2004;18(5):407–13.
358. Hoogland ICM, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation*. 2015;12(1):114.
359. Koriyama Y, Nakayama Y, Matsugo S, Sugitani K, Ogai K, Takadera T, et al. Anti-inflammatory effects of lipoic acid through inhibition of GSK-3B in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglial cells. *Neurosci Res*. 2013;77(1–2):87–96.
360. Monk JM, Liddle DM, De Boer AA, Brown MJ, Power KA, Ma DW, et al. Fish-Oil-Derived n–3 PUFAs Reduce Inflammatory and Chemotactic Adipokine-Mediated Cross-talk between Co-cultured Murine Splenic CD8+ T Cells and Adipocytes. *J Nutr*. 2015;145(4):829–38.
361. De Boer AA, Monk JM, Liddle DM, Hutchinson AL, Power KA, Ma DWL, et al. Fish-oil-derived n-3 polyunsaturated fatty acids reduce NLRP3 inflammasome activity and obesity-related inflammatory cross-talk between adipocytes and CD11b+ macrophages. *J Nutr Biochem*. 2016;34:61–72.
362. Cotogni P, Trombetta A, Muzio G, Maggiora M, Canuto RA. The Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid Modulates Inflammatory Mediator Release in Human Alveolar Cells Exposed to Bronchoalveolar Lavage Fluid of ARDS Patients. *Biomed Res Int*. 2015;2015(1):1–11.
363. Wijendran V, Brenna JT, Wang DH, Zhu W, Meng D, Ganguli K, et al. Long-chain polyunsaturated fatty acids attenuate the IL-1 β -induced proinflammatory response in human fetal intestinal epithelial cells. *Pediatr Res*. 2015;78(6):626–33.
364. Costantini C, Cassatella MA. The defensive alliance between neutrophils and NK cells as a novel arm of innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2011;89(2):221–33.
365. He H, Geng T, Chen P, Wang M, Hu J, Kang L, et al. NK cells promote

- neutrophil recruitment in the brain during sepsis-induced neuroinflammation. *Sci Rep.* 2016;6(1):27711.
366. Andonegui G, Zelinski EL, Schubert CL, Knight D, Craig LA, Winston BW, et al. Targeting inflammatory monocytes in sepsis-associated encephalopathy and long-term cognitive impairment. *JCI Insight.* 2018;3(9):1–20.
367. Vieira AA, Michels M, Florentino D, Nascimento DZ, Rezin GT, Leffa DD, et al. Obesity promotes oxidative stress and exacerbates sepsis-induced brain damage. *Curr Neurovasc Res.* 2015;12(2):147–54.
368. Zarbato GF, de Souza Goldim MP, Giustina A Della, Danielski LG, Mathias K, Florentino D, et al. Dimethyl fumarate limits neuroinflammation and oxidative stress and improves cognitive impairment after polymicrobial sepsis. *Neurotox Res.* 2018;34(3):418–30.
369. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med.* 2007 Jan;42(2):153–64.
370. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003;9(4):169–76.
371. Denny Joseph KM, Muralidhara M. Neuroprotective efficacy of a combination of fish oil and ferulic acid against 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress and neurotoxicity in rats: behavioural and biochemical evidence. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014;39(4):487–96.
372. Denny Joseph KM, Muralidhara M. Enhanced neuroprotective effect of fish oil in combination with quercetin against 3-nitropropionic acid induced oxidative stress in rat brain. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2013;40(1):83–92.
373. Denny Joseph KM, Muralidhara M. Combined Oral Supplementation of Fish Oil and Quercetin Enhances Neuroprotection in a Chronic Rotenone Rat Model: Relevance to Parkinson's Disease. *Neurochem Res.* 2015;40(1):894–905.
374. Körner A, Schlegel M, Theurer J, Frohnmeyer H, Adolph M, Heijink M, et al. Resolution of inflammation and sepsis survival are improved by dietary Ω -3 fatty acids. *Cell Death Differ.* 2018;25(2):421–31.
375. Park Y, Nam S, Yi H-J, Hong H-J, Lee M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids increase oxidative stress in rats with intracerebral hemorrhagic stroke. *Nutr Res.* 2009;29(11):812–8.

376. Tsuduki T, Honma T, Nakagawa K, Ikeda I, Miyazawa T. Long-term intake of fish oil increases oxidative stress and decreases lifespan in senescence-accelerated mice. *Nutrition*. 2011;27(3):334–7.
377. Ide T. Physiological activities of the combination of fish oil and α -lipoic acid affecting hepatic lipogenesis and parameters related to oxidative stress in rats. *Eur J Nutr*. 2018;57(4):1545–61.

ANEXO

ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 07 de abril de 2016
Registro na CEUA (código): 15.043.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Fabricia Cardoso Petronilho

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Estudo pré-clínico com a utilização de nutracêuticos sobre a mortalidade e parâmetros bioquímicos e comportamentais na sepse em ratos”, registrada com o nº 15.043.4.01.IV, sob a responsabilidade de “Fabricia Cardoso Petronilho” - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 17/03/2016.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal; enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente



Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão