



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
ANDRIELE APARECIDA DA SILVA VIEIRA

**A INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NA ENCEFALOPATIA SÉPTICA: ESTUDO A
PARTIR DE UM MODELO ANIMAL**

Tubarão
2014

ANDRIELE APARECIDA DA SILVA VIEIRA

**A INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NA ENCEFALOPATIA SÉPTICA: ESTUDO A
PARTIR DE UM MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Universidade do Sul de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de mestra em Ciências da Saúde.

Prof. Orientadora: Fabrícia Cardoso Petronilho, Dra.

Prof. Co-Orientadora: Jucélia Jeremias Fortunato, Dra

Tubarão

2014

ANDRIELE APARECIDA DA SILVA VIEIRA

**A INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NA ENCEFALOPATIA SÉPTICA: ESTUDO A
PARTIR DE UM MODELO ANIMAL**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde e aprovado em sua forma final pelo Curso de Pos-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Sul de Santa Catarina.

Tubarão, 28 de novembro de 2014.

Orientadora Fabrícia Petronilho, Dra.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Co-Orientadora: Jucélia Jeremias Fortunato, Dra
Universidade do Sul de Santa Catarina

Professora Gislaine Tezza Rezin, Dra.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Professora Talita Tuon, Dra.
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Dedico esse trabalho à minha família, que proporcionaram todos os meios e a estrutura para realização do mesmo. Com todo amor e carinho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades e conquistas, por dar-me força, coragem, sabedoria e paciência para seguir em frente.

À minha família, meu suporte, minha base e fortaleza, pela paciência, compreensão e incentivo em todos os momentos.

À minha irmã Daniele, pela parceria, companheirismo, compreensão e apoio sem igual.

“... Mestre não é somente o que ensina fórmulas, regras, raciocínios, mas o que questiona e desperta para a realidade...”. Agradeço a minha Orientadora Fabricia Petronilho por toda ajuda e dedicação durante o período de confecção deste.

Às amigas que fiz durante o mestrado, à Monique, minha dupla, obrigada pela paciência em me ensinar e auxiliar sempre que precisei, companheira para todos os momentos. À Driélly sempre muito prestativa, mostrou-se uma grande amiga nos momentos de dificuldades e à Andressa, colega de classe, motivadora, divertida e parceira sem igual nessa fase.

Aos integrantes do FICEXP, Luci, André, Luiz, Driélly e Monique, que me receberam de braços abertos e me ensinaram tudo com tanto carinho e paciência, o tempo nos fez além de colegas, amigos. Aos não menos importantes, alunos de iniciação científica, que se integraram ao grupo nesse meio tempo, meu muito obrigada por toda ajuda e disponibilidade.

Às amigas que me escutaram e apoiaram durante todo esse período, Renata, Glaicon, Ana Claudia e Maiara. Obrigada por se fazerem presentes sempre.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças à Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

RESUMO

A sepse é uma doença de caráter heterogêneo e complexo, definida como uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS), associada a um quadro de infecção sendo a maior causa de morbidade e mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). O dano cerebral contribui severamente para o aumento das taxas de mortalidade. A sepse e suas consequências podem ser exacerbadas quando associadas a um quadro de inflamação crônica, como a obesidade. Na obesidade ocorre aumento dos níveis de várias citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda. Quando essa situação é exposta a um insulto inflamatório agudo, como a sepse, os tecidos tornam-se mais vulneráveis à lesão via inflamação exagerada. Portanto, o objetivo é avaliar a suscetibilidade a encefalopatia séptica em ratos obesos. Foram utilizados ratos machos, pertencentes à linhagem Wistar (*rattus norvegicus*), com idade de 60 dias, pesando entre 250-300g. Os grupos experimentais foram divididos em Sham (controle) + Eutrofia, Sham + Obesidade, CLP (ligação e perfuração cecal) + Eutrofia e CLP + Obesidade. Durante dois meses os animais foram induzidos à obesidade através da alimentação hipercalórica e após, submetidos a sepse por CLP. A avaliação quantitativa do aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) foi investigada no hipocampo, córtex e córtex pré-frontal nos tempos de 12 e 24h após a indução de sepse assim como foram quantificadas as concentrações de nitrito/nitrato, a atividade de mieloperoxidase (MPO), os parâmetros de dano oxidativo em lipídios e proteínas e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os dados foram avaliados por ANOVA seguido pelo teste post hoc Tukey e os resultados foram considerados significantes para $p < 0.05$. Os dados encontrados indicam que em ratos obesos e submetidos a sepse ocorre um aumento de permeabilidade da BHE em diferentes regiões cerebrais em comparação com ratos eutróficos sépticos. Essa alteração refletiu sobre a migração de neutrófilos, concentração de nitrito/nitrato, dano oxidativo em lipídios e proteínas e um desequilíbrio das defesas antioxidantes, especialmente, 24 horas após a sepse. Conclui-se que a obesidade devido ao seu fenótipo pró-inflamatório exacerba o quadro clínico já conhecido da sepse, podendo assim agravar ou precipitar a encefalopatia séptica (ES) e contribuir para disfunção e degeneração neuronal.

Palavas-chaves: Sepse. Encefalopatia séptica. Obesidade.

ABSTRACT

Sepsis is a heterogeneous character of disease and complex, defined as a systemic inflammatory response (SIRS) associated with a frame of infection is a major cause of morbidity and mortality in intensive care units. The brain damage contributes heavily to the increase in mortality rates. Sepsis and its consequences may be exacerbated when associated with a chronic inflammatory condition, such as obesity. In obesity is an increase in the levels of several pro-inflammatory cytokines and acute phase proteins. When this situation is exposed to an acute inflammatory insult, such as sepsis, tissues become more vulnerable to damage through excessive inflammation. Therefore, the objective is to evaluate the susceptibility to septic encephalopathy in obese mice. Will be used male rats Wistar (*Rattus rattus*), aged 60 days, weighing 250-3000g. The experimental groups will be divided into sham (control) + Eutrophia, Sham + Obesity, CLP + Eutrophia and CLP + Obesity. For two months the animals will be induced obesity by high calorie food and sepsis by cecal ligation and puncture (CLP). The quantitative evaluation of increased permeability of the blood-brain barrier (BBB) is investigated in the hippocampus, cortex and prefrontal cortex of the 12 and 24 days after induction of sepsis as well as will be quantified nitrite / nitrate concentrations, myeloperoxidase activity (MPO), the parameters of oxidative damage to lipids and proteins and the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The data were evaluated by ANOVA followed by post hoc Tukey and statistical significance will be considered for values of $p < 0.05$. The data indicate that in obese mice and subjected to sepsis occurs an increase of BBB permeability in different brain regions compared to eutrophic septic rats. This change reflected on neutrophil migration, concentration of nitrite/nitrate, oxidative damage to lipids and proteins and an imbalance of antioxidant defenses especially 24 hours after sepsis. It follows that obesity due to its pro-inflammatory phenotype exacerbates the already known clinical sepsis and can therefore aggravate or precipitate septic encephalopathy (ES) and contribute to neuronal dysfunction and degeneration.

Key Words: Sepsis. Septic encephalopathy. Obesity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Rolamento, adesão e migração de neutrófilos para o foco infeccioso	21
Figura 2 – Desenho experimental do estudo proposto	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso final total, comprimento naso-anal, índice de Lee e consumo alimentar34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1A – Permeabilidade da barreira hematoencefálica 12h	35
Gráfico 1B – Permeabilidade da barreira hematoencefálica 24h	35
Gráfico 2A – Atividade da Mieloperoxidase 12h	36
Gráfico 2B – Atividade da Mieloperoxidase 24h	37
Gráfico 3A – Concentração de Nitrito/Nitrato 12h	37
Gráfico 3B – Concentração de Nitrito/Nitrato 24h.....	38
Gráfico 4A – Equivalente de MDA 12h	39
Gráfico 4B – Equivalente de MDA 24h	39
Gráfico 5A – Proteínas Carboniladas 12h	40
Gráfico 5B – Proteínas Carboniladas 24h	40
Gráfico 6A – Atividade da SOD 12h.....	41
Gráfico 6B – Atividade da SOD 24h.....	42
Gráfico 6C – Atividade da CAT 12h.....	42
Gráfico 6D – Atividade da CAT 24h.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância de uma via
BHE – Barreira hematoencefálica
CAT – Catalase
CD 14 – Grupo de Diferenciação 14 (*Cluster of differentiation 14*)
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CLP – Ligadura e punção do ceco (*Cecal Ligation Puncture*)
ES – Encefalopatia Séptica
ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
EUA – Estados Unidos da América
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
H₃PO₄ – Ácido Fosfórico
IMC – Índice de Massa Corporal
IFN - γ - Interferon γ
IL – Interleucina
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
JA – Junções apertadas
JAE – Junções endoteliais aderentes
LBP - LPS – Proteína de Ligação (*Binding Protein*)
LPS – Lipopolissacarídeos
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos -1
MPO – Mieloperoxidase
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidreto
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAMP – Padrões moleculares relacionados aos patógenos
POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares
RRP – Receptores de reconhecimento de padrão
SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SNC – Sistema Nervoso Central
SOD – Superóxido dismutase
SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

TAM – Tecido Adiposo Marrom

TAB – Tecido Adiposo Branco

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

TNF α – Fator de Necrose Tumoral alfa (Tumor necrosis factors)

TLR – Receptor Toll-like (*Toll-like receptor*)

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

UTIs – Unidades de Tratamento Intensivo

LISTA DE SÍMBOLOS

α Alfa

β Beta

% Porcentagem

® Marca Registrada

$\pm$ Mais ou menos

< Menor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 DEFINIÇÃO DE SEPSE E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	16
1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE	17
1.3 ENCEFALOPATIA SÉPTICA	18
1.4 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	19
1.5 INFILTRADO DE NEUTRÓFILOS	20
1.6 RADICAIS LIVRES E NEUROINFLAMAÇÃO NA SEPSE	21
1.7 OBESIDADE	22
1.8 OBESIDADE E SEPSE	23
1.9 MODELO ANIMAL DE SEPSE E OBESIDADE	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. ETAPAS METODOLÓGICAS	29
3.1 ANIMAIS	29
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	29
3.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO	29
3.4 MODELOS ANIMAIS	29
3.4.1 Indução de Obesidade	29
3.4.2 Indução de Sepses	30
3.4.3 Grupos experimentais	30
3.5 ANÁLISES	31
3.5.1 Permeabilidade da barreira hematoencefálica	31
3.5.2 Concentração de nitrito e nitrato	32
3.5.3 Atividade da mieloperoxidase	32
3.5.4 Dano oxidativo em lipídios e proteínas	32
3.5.5 Atividade da superóxido dismutase e catalase	33
3.5.6 Quantificação de proteínas	33
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4. RESULTADOS	34
4.1 Avaliação do peso, índice de Lee e consumo alimentar	34
4.2 Permeabilidade da barreira hematoencefálica	34

4.3 Atividade da mieloperoxidase e concentração de nitrito e nitrato.....	35
4.4 Estresse oxidativo: TBARS e carbonilação de proteínas	38
4.5 Atividade Antioxidante	41
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE : DEFINIÇÕES E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A sepse é uma doença de caráter heterogêneo e complexo, definida no ano de 1991 através do consenso da *American College of Chest Physicians* e da *Society of Critical Care Medicine*, como uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS) associada a um quadro de infecção.¹⁻⁴ Durante a sepse o sistema imune torna-se incapaz de conter a disseminação de microrganismos patogênicos no decorrer da infecção, iniciando assim uma complexa cascata de eventos.⁵ As principais fontes de infecção são: pulmonar, urinária, abdominal, cutânea e cateteres vasculares,⁶ Quando a sepse está associada à disfunção orgânica, hipotensão ou hipertensão é caracterizada como sepse grave, e quando o quadro de hipotensão não é revertido apesar da adequada reposição volêmica com a presença de anormalidades da perfusão é chamado de choque séptico.⁷

Sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, a sepse é um dos motivos mais comuns de internação e complicações em Unidades de Terapia Intensiva (UTI).⁸⁻¹⁰ Segundo Mayr et al., a sepse grave tem uma incidência estimada de 300 casos a cada 100.000 pessoas nos Estados Unidos, metade desses casos ocorrem fora da UTI e 25% dos pacientes que desenvolvem sepse grave morrem durante a internação. O choque séptico está diretamente associado a um aumento da mortalidade, aproximando-se de 50 %.^{11,12}

No Brasil nos últimos 10 anos a incidência de sepse aumentou cerca de 13 % com relação a década anterior. Nos hospitais, cerca de 17 % dos leitos de UTIs são ocupados por pacientes com sepse grave e a taxa de mortalidade é de aproximadamente 55 % dos pacientes sépticos.¹³

Dentre os principais motivos para o aumento na incidência de sepse pode-se citar o aumento no número de pacientes imunocomprometidos, uso frequente de antibióticos, aumento da expectativa de vida e aumento da frequência de procedimentos invasivos.^{14,15} Além dos dados expressivos referente à mortalidade, a sepse causa preocupação também no setor econômico. Nos EUA, os custos por ano para o tratamento da sepse ultrapassam 16 bilhões de dólares.¹⁶

1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

Na sepse o processo inflamatório é iniciado no foco da infecção, onde existe a proliferação dos microrganismos e liberação de diversos compostos, como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos e exotoxinas, os quais podem também invadir a circulação sistêmica.¹⁷

A relação estabelecida entre hospedeiro e microrganismos se inicia através do reconhecimento de substâncias do agente etiológico, onde se podem destacar os chamados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), estruturas moleculares não variáveis expressas por grupos de patógenos, as quais são normalmente significantes para a virulência ou sobrevivência do agente como as endotoxinas dos microorganismos gram-negativos (principalmente LPS) e o ácido teicóico dos microorganismos gram-positivos.¹⁸ Os PAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão (RRP), os quais são expressos por células do sistema imune inato podendo ser representados pelos receptores *Toll-like* (TLR).¹⁹

Nos casos de infecção derivada de bactérias gram-negativas, as endotoxinas são transferidas aos receptores CD14 e *Toll-like 4* (TLR4) existentes na superfície de células do sistema imune inato, como monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, por uma proteína plasmática ligadora de LPS chamada *LPS-binding protein* (LBP).²⁰ Quanto às infecções por bactérias gram-positivas, outro receptor *Toll-like*, o *Toll-like 2* (TLR2), é responsável pela sinalização da presença dos peptidoglicanos destas bactérias. O polimorfismo nestes receptores insinua possível atuação decisiva na evolução para sepse grave e choque séptico.²¹

Estes componentes desencadeiam uma cascata inflamatória, onde inicialmente é liberado o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e a Interleucina-1 β (IL-1 β), os quais favorecem uma intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de granulócitos. Esses mediadores, por sua vez, são responsáveis pela reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória, gerando assim um ciclo vicioso inflamatório.^{22,23}

A liberação exacerbada de mediadores inflamatórios pode causar alterações hemodinâmicas, como extravasamento capilar, vasodilatação e redução do tônus do miocárdio, além de alterações na coagulação sanguínea.^{24,25}

Segundo Vincent e Korkut, na sepse ocorre um desequilíbrio entre o consumo e a disponibilidade de oxigênio, podendo levar ao quadro de hipóxia tecidual. A fim de priorizar

a utilização do oxigênio para as áreas mais importantes, como cérebro e miocárdio, ocorrem alterações na microcirculação e o fluxo sanguíneo em outras áreas é insuficiente. O tempo de duração dessa situação pode levar a importantes alterações celulares e teciduais, desenvolvendo-se a síndrome de disfunção múltipla de órgãos, dentre os órgãos mais afetados estão cérebro, fígado, pulmão, rins e coração.²⁶

1.3 ENCEFALOPATIA SÉPTICA

A encefalopatia séptica (ES) é uma disfunção cerebral resultante de alterações metabólicas e de sinalização celular, é uma complicação comum, porém pouco compreendida na sepse.²⁷⁻²⁹

A ES pode atingir de 9 a 71 % dos pacientes sépticos, a mesma é decorrente da interação e da sobreposição de diferentes mecanismos relacionados à resposta inflamatória sistêmica, como mediadores pro e anti-inflamatórios, cascata de complemento, estresse oxidativo, disfunção endotelial, falência microvascular, disfunção da barreira hematoencefálica (BHE), entre outros. Todos esses fatores levam a morte celular, ou seja, o desenvolvimento da doença esta diretamente relacionada à resposta inflamatória do que com o agente infeccioso em si.^{27,30,31}

Segundo Wilson e Young, a patogênese da ES não está relacionada apenas a toxinas patogênicas, uma vez que pode ter relação também com a SIRS, onde não possuem uma etiologia infecciosa.³² Estudos realizados com animais e humanos indicam que a associação de fatores, incluindo a geração local de citocinas pró-inflamatórias, microcirculação cerebral comprometida, desequilíbrio de neurotransmissores entre outros, contribuem para o desenvolvimento da ES³³⁻³⁵. Nos casos de persistência do quadro de inflamação, a excitotoxicidade e o estresse oxidativo pode agravar ainda mais a ES e contribuir para disfunção e degeneração neuronal.³²

Esta doença está associada à alta mortalidade hospitalar (16 a 63%), como também a limitações cognitivas e funcionais em longo prazo para aqueles que sobrevivem.^{28,36} A ES costuma ser um evento precoce no decorrer da historia natural da doença, surgindo frequentemente antes da disfunção dos demais órgãos, e associada a um pior prognóstico, quando presente.^{37,38}

1.4 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

A BHE trata-se de uma estrutura física e metabólica³⁹ localizada na interface entre o tecido cerebral e o sangue.⁴⁰

No final do século XIX, na Alemanha, o conceito de BHE surgiu através de experimentos do cientista Paul Ehrlich onde, após injeções de corantes em animais tanto na circulação arterial como na venosa todos os órgãos, exceto o cérebro e a medula espinhal, se coravam, levando a hipótese de dois compartimentos. Existiam evidências de estudos realizados por Bield e Kraus em 1898 e de Lewandowsky em 1900, onde atribuíram a ausência de efeitos farmacológicos no sistema nervoso central (SNC) quando os fármacos eram administradas de forma sistêmica.⁴¹

Em 1913, Edwin Goldmann notou o fenômeno oposto injetando um corante diretamente no fluido cérebro espinhal, de animais, o qual manchou todo o SNC e nenhum dos órgãos periféricos.⁴² Décadas depois Reese, Karnovsky e Brightman repetiram as experiências do pesquisador hora citado, ao nível ultraestrutural, por meio da microscopia eletrônica, identificando os capilares do SNC e a célula endotelial como o sítio da BHE.⁴¹

Essa barreira física e metabólica é um importante componente da rede de comunicação que conecta o SNC e os tecidos periféricos, além de funcionar como uma interface que limita e regula a troca de substâncias entre sangue e o sistema nervoso central (SNC).⁴³

Segundo Cardoso, Brites e Brito, as principais funções da BHE em condições normais são: a manutenção da homeostase do SNC e a proteção do cérebro, desde o ambiente extracelular, o abastecimento constante de nutrientes por sistemas específicos de transporte e o direcionamento das células inflamatórias para agir em resposta a mudanças no ambiente local.⁴⁴

A BHE é formada por endotélio dos capilares cerebrais, que é caracterizado por cada aresta celular intimamente unida as células adjacentes, selando assim as fissuras intercelulares responsáveis por tornar impermeável a parede interna do capilar cerebral, estas fissuras são nomeadas de junções apertadas (JA) e as junções endoteliais aderentes (JEA) que são as principais reguladoras da permeabilidade da barreira.⁴⁵

Além da função de permeabilidade seletiva, a BHE possui aspectos importantes como função neuroimune, incluindo a secreção de citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico. A BHE pode receber o estímulo de um compartimento (p.ex. o sistêmico) e, simultaneamente,

responder com secreções para o outro (p.ex. SNC), sendo esta função de papel central na resposta neuroimune.⁴³

A BHE é capaz de modular a resposta através da sua estrutura física, podendo aumentar a permeabilidade do endotélio, permitindo a proteção do encéfalo e a manutenção da homeostase, promovendo assim a limitação da lesão e a cura, porém quando a neuroinflamação ocorre de forma crônica as junções presentes nas BHE dissociam-se entre si, ocorrendo a formação de edema e lesão no tecido adjacente e consequentemente lesão encefálica.⁴⁶

Uma possível disfunção da BHE em consequência da neuroinflamação constitui uma chave para o desenvolvimento e progressão de várias enfermidades do SNC.^{40,47}

Em modelo animal, 24h após a indução de sepse, ocorre aumento da permeabilidade da BHE, retornando aos níveis basais em 48 e 96 horas.⁴⁸ Outro estudo demonstrou que durante o quadro de sepse aguda ocorre aumento da produção de citocinas e quimiocinas, favorecendo a disfunção e alterações na permeabilidade da BHE, reforçando assim o papel da resposta inflamatória e disfunção e lesão cerebral.⁴⁹

1.5 INFILTRADO DE NEUTRÓFILOS E SEPSE

Durante o processo inflamatório, este podendo ser causado por diversos agentes nocivos como: microorganismos (bactérias, vírus, fungos), queimaduras, trauma físico ou células tumorais, o recrutamento leucocitário para o local da lesão é essencial para o início da resposta imune e defesa do organismo.^{50,51}

No início do processo infeccioso as primeiras células imunes predominantes no local da injúria são os neutrófilos, permanecendo em geral de 12 a 24 horas no local. Após esse período, os neutrófilos iniciam um processo de morte programada sendo em seguida fagocitado por macrófagos. Após a décima hora surgem progressivamente os eosinófilos, macrófagos e linfócitos, permanecendo por cerca de uma semana no local nos casos onde o agente agressor for removido, caso contrário, ocorre a cronificação do processo.⁵¹

O processo de migração inclui as seguintes fases: rolamento, adesão e transmigração ou diapedese (Figura 1). Os leucócitos presentes na corrente sanguínea migram para o sítio de lesão. O recrutamento das células inflamatórias se inicia pela ativação das moléculas de adesão da família das selectinas presentes nas células endoteliais; o leucócito se liga fracamente ao endotélio e, devido ao fluxo sanguíneo, é propulsionado a rolar ao longo da superfície endotelial. Em seguida, ocorre uma imobilização do leucócito sobre a superfície do

endotélio vascular, por meio de forte adesão através de integrinas (presentes na superfície do leucócito) e moléculas de adesão expressas na célula endotelial; o leucócito então migra pelos espaços celulares interendoteliais e é guiado ao seu destino final, para desempenhar suas funções.⁵²

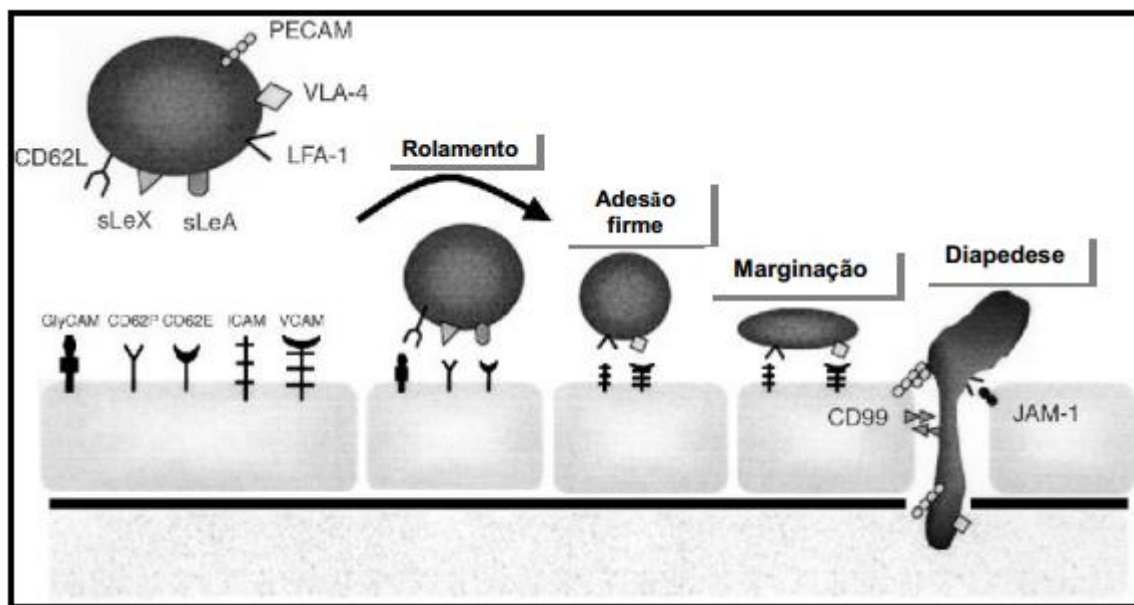


Fig 1: Rolamento, adesão e migração de neutrófilos para o foco infeccioso.

Fonte: Adaptado de Ley et al.⁵³

Durante a sepse, a produção exacerbada de citocinas e quimiocinas alteram as estruturas cerebrais e, conseqüentemente, aumentam a permeabilidade da BHE levando a um aumento do fluxo de células inflamatórias e mediadores tóxicos para o cérebro contribuindo para a lesão neuronal.⁴⁹

1.6 RADICAIS LIVRES E NEUROINFLAMAÇÃO NA SEPSE

Entende-se por radical livre como qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos. Isto determina uma atração para um campo magnético, o que pode torná-lo altamente reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons.⁵⁴

Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. As principais

fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos.⁵⁴

Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) ou Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. As ERO e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Quando a produção dessas espécies é exacerbada, e o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, o dano celular a lipídios, proteínas e outros componentes torna-se inevitável.^{55,56}

O estresse oxidativo é um dos vários e mais importantes mecanismos envolvidos na fisiopatologia da sepse. O SNC está sujeito a danos causados pelas EROs devido o alto consumo de O₂ e o baixo nível de defesas antioxidantes.⁵⁷ Observou-se em estudo prévio utilizando modelo animal de sepse, o dano oxidativo no tecido cerebral entre 0 a 96 horas após a indução de sepse por CLP em ratos, onde foi verificado o dano às proteínas e lipídios no hipocampo, córtex cerebral, cerebelo e estriado.⁵⁸ Além disso ainda em estudo em modelo animal de sepse verificou-se que os radicais livres induzem adicionalmente a apoptose neuronal em determinadas regiões do cérebro e, assim, podem provocar déficit cognitivo que pode persistir após a recuperação clínica de sepse.^{59,60}

1.7 OBESIDADE

A Organização Mundial de Saúde (OMS), define obesidade como acúmulo excessivo de gordura corporal, o qual tem potencial prejuízo à saúde, normalmente relacionado a fatores variados, os quais podem ser genéticos, ambientais, biológicos, sociais, dentre outros, que interagem na etiologia dessa doença.⁶¹

Todos os fatores envolvidos na etiologia da obesidade convergem para um ponto em comum, o balanço energético positivo, este pode ser definido como a diferença entre a quantidade energética ingerida e a quantidade de energia gasta nas atividades em geral e nas funções vitais, o excesso é armazenado continuamente no tecido adiposo.^{62,63}

A obesidade tornou-se problema de saúde pública caracterizando-se como uma epidemia global, uma vez que as consequências para a saúde são muitas e variam do risco

aumentado de morte prematura a graves doenças não letais, porém debilitantes, que afetam diretamente a qualidade de vida. Essa doença apresenta prevalência significativa em todas as faixas etárias, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento.^{64,65}

A prevalência de obesidade cresce de forma significativa nos últimos anos, principalmente em países desenvolvidos, sendo comum também em países em desenvolvimento, como o Brasil. Dentre as regiões do país, a Sul apresenta as maiores prevalências de obesidade, sendo semelhantes e até superiores a países desenvolvidos.⁶⁶

Segundo Flegal et al., nos EUA estima-se que a prevalência de obesidade seja de 32,2 % em homens adultos e 35,5 % em mulheres adultas, percentuais esses que se elevam para 72,3 % e 64,1 %, respectivamente, quando se trata de sobrepeso e obesidade.⁶⁷ De acordo com a OMS, no mundo existirá no ano de 2015 aproximadamente 2,3 bilhões de adultos em estado de sobrepeso e 700 milhões de obesos.⁶¹

No Brasil de acordo com o Programa de Orçamento Familiar (POF) 2008 – 2009 o excesso de peso quase triplicou entre homens, de 18,5 % em 1974-75 para 50,1 % em 2008-09. Nas mulheres, o aumento foi menor: de 28,7 % para 48 %, respectivamente. Quanto a região sul, o excesso de peso no sexo masculino apresentou-se mais significativo, o qual subiu de 23 % para 56,8 %.⁶⁸

A obesidade está diretamente ligada ao aparecimento de diversas co-morbidades, as quais interferem de forma substancial na qualidade de vida e em muitos casos agravam o quadro clínico dos pacientes.⁶⁸ Dentre as co-morbidades, destacam-se diabetes tipo 2, cânceres e doenças cardiovasculares e devido o conhecimento da incidência dessas doenças em indivíduos obesos, tem-se prestado mais atenção na resposta inflamatória do tecido adiposo branco, considerado hoje um importante órgão endócrino metabolicamente ativo.^{69,70}

1.8 OBESIDADE E SEPSE

A obesidade está associada a um estado de inflamação, com o aumento dos níveis de várias citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda. Essa doença também é considerada um fator de risco independente para o estresse oxidativo e disfunção endotelial.⁷¹⁻

74

O tecido adiposo humano é dividido em tecido adiposo marrom (TAM), localizado no SNC, com função termogênica, possui mais vascularização e maior número de mitocôndrias, e tecido adiposo branco (TAB), situado nas regiões periféricas, subcutânea e visceral, armazena energia na forma de triglicerídios e participa da regulação do balanço

energético mediante processos de lipogênese e lipólise. Essa subdivisão do tecido adiposo é composta por adipócitos, tecido conjuntivo, nervoso e vascular, e células do sistema imune.⁷⁵

O TAB é considerado um importante órgão endócrino, ele secreta várias substâncias bioativas de ação local ou sistêmica, essas por sua vez são chamadas de adipocinas e estão envolvidas em processos metabólicos, imunes e neuroendócrinos.^{76,77}

Dentre essas adipocinas, a leptina tem sua liberação proporcional à massa de tecido adiposo. Essa adipocina exerce atividades pró-inflamatória e fornece proteção contra infecções. A mesma tem ação direta na proteção dos linfócitos a partir de apoptose, na regulação da proliferação de linfócitos T e na ativação e a produção de citocinas. A leptina também atua como moduladora da secreção de citocinas tais como TNF- α e IL-6. Na literatura existem ainda estudos que mostram que o aumento nos níveis de leptina favorece a maior mortalidade na sepse, em contrapartida existem autores que não relataram essa correlação.⁷⁸⁻⁸⁰

Acredita-se então, que a leptina, dentre outros papéis desempenhados no organismo contribua para o quadro de inflamação crônica associado à obesidade.^{70,72}

Outra importante substância biotiva é a adiponectina, está é a única da sua classe com efeito anti-inflamatório, antidiabético e antiaterogênico. Dentre suas funções ela reduz a expressão de TNF- α , diminui a quimiotaxia de macrófagos, inibe a adesão de monócitos, inibe a transformação de macrófagos em células espumosas, aumenta a produção de óxido nítrico e estimula a angiogênese.^{81,82}

Em um estudo feito com camundongos com deficiência de adiponectina, percebeu-se que os mesmos desenvolveram prematuramente intolerância à glicose, resistência insulínica, aumento sérico dos ácidos graxos não esterificados e proliferação da musculatura lisa dos vasos.⁸³

Vachharajani et al., realizaram um estudo para avaliar os efeitos da deficiência de adiponectina no cérebros de ratos sépticos, e concluíram que a carência dessa adipocina contribui para a disfunção microvascular do cérebro durante a sepse, aumentando a migração de leucócitos e de plaquetas de adesão, favorecendo o aumento da permeabilidade da BHE. Estes processos podem ser exagerados pela inflamação crônica característica da obesidade.⁸⁴

Outra proteína produzida por adipócitos que exerce influência sobre o processo inflamatório na obesidade é a resistina, esta atua como um agente pró-inflamatório. A mesma demonstrou atuar diretamente sobre as células endoteliais, induzindo assim a liberação de endotelina-1, de proteína quimiotática de monócitos – 1 (MCP-1) e aumento da expressão das

moléculas de adesão, favorecendo assim o aumento da expressão pró-inflamatória e diminuição dos níveis de citocinas anti-inflamatórias.⁸⁵⁻⁸⁷

A obesidade possui ainda como importantes marcadores inflamatórios o TNF- α e IL-6. O primeiro é secretado pelo TAB, sua excreção está diretamente ligada ao tamanho da massa adiposa corporal. O TNF- α produzido no tecido adiposo reprime a expressão de genes envolvidos na captação e armazenamento de ácidos graxos livres e glicose; suprime genes de fatores de transcrição envolvidos na lipogênese; reduz a expressão da adiponectina e aumenta a da IL-6. Essa interleucina estimula a produção de outras interleucinas e proteínas de fase aguda associadas ao processo inflamatório.⁸⁸⁻⁹⁰

Desempenhando funções semelhantes à do TNF- α , a IL-6 está correlacionada à obesidade e à resistência insulínica. A IL-6 suprime a expressão de adiponectina, receptores e sinalizadores de insulina. Essa citocina se apresenta elevada em pessoas obesas e a possível perda de peso promove diminuição dos seus níveis plasmáticos.⁹¹ A IL-6 também pode exercer funções anti-inflamatórias desde que a expressão de TNF- α e do Interferon γ (IFN- γ) apresentem-se diminuídas.^{92,93}

O aumento dos marcadores inflamatórios comuns na obesidade são derivados da produção destes pelos próprios adipócitos e pelos macrófagos infiltrados em resposta à hipóxia. Do mesmo modo que há também liberação de marcadores inflamatórios em outros órgãos, muitas vezes com produção estimulada por fatores secretados no TAB.⁸⁹

A obesidade esta fortemente associada com estado inflamatório crônico, que é diretamente proporcional à quantidade de TAB no corpo. De acordo com Vachharajani e Vital, é possível que indivíduos obesos quando expostos a um estímulo inflamatório, como a sepse ou choque séptico, tenham uma resposta exacerbada quando comparados com indivíduos eutróficos.⁹⁴

Scott et al., realizaram estudos envolvendo obesidade e sepse em modelo animal, os mesmos identificaram diferenças na expressão cerebral e hepática de ratos obesos com relação aos eutróficos, salientando que existem algumas diferenças na maneira em que os animais obesos respondem a sepse em comparação com animais magros.^{95,96}

El-Solh et al., relataram aumento da morbidade e da mortalidade em pacientes obesos da UTI. Além do aumento na mortalidade de pacientes obesos (30 %) comparados aos eutróficos (17 %), observaram também o aumento da morbidade definida como um aumento número de dias em ventilação mecânica.⁹⁷

O impacto causado pela obesidade na população também foi estudado por Yaegashi et al., onde os pacientes obesos foram divididos em dois grupos: Grupo 1, com

índice de massa corporal (IMC) de 30 a 40 kg/m² e Grupo 2 IMC > 40 kg/m². Como resultado da pesquisa verificaram maior taxa de mortalidade no Grupo 2 em comparação ao Grupo 1. Relataram também que os pacientes do Grupo 2 apresentaram maior morbidade na forma de complicações como sepse, pneumonia nosocomial, síndrome da angústia respiratória aguda, infecções relacionadas ao cateter venoso central, traqueostomia e insuficiência renal aguda, quando comparados aos pacientes do Grupo 1.⁹⁸

A obesidade, como processo único, caracteriza-se como um estado inflamatório crônico. Incluindo muitos mecanismos, como a secreção próinflamatória de adipocinas, ativação de macrófagos, aumento da secreção de várias citocinas, estresse oxidativo, aumento da resistência à insulina, esses por sua vez agem em conjunto produzindo e conduzindo a um quadro de disfunção endotelial em obesidade. Quando essa situação é exposta a um insulto inflamatório agudo, como a sepse, estes tecidos são mais vulneráveis à lesão via inflamação exagerada.^{99,100}

1.9 MODELOS ANIMAIS DE SEPSE E OBESIDADE

A indução da obesidade em modelos experimentais com roedores é feita através da exposição a dietas ricas em gorduras por períodos prolongados, resultando assim em balanço energético positivo e, conseqüentemente, obesidade, sendo considerado um modelo de obesidade humana. Uma dieta com alto teor de gordura e carboidratos similar à de *fast food* (dieta de cafeteria) tem implicações pronunciadas no desenvolvimento de obesidade, levando a um ganho de peso e deposição de gordura corporal. Assim a obesidade induzida por dieta de cafeteria reflete um modelo de obesidade animal não genético.¹⁰¹

Para indução da sepse, vários modelos animais têm sido desenvolvidos e aplicados, a fim de reproduzir a vasodilatação, hipotensão, aumento do débito cardíaco, resposta ao tratamento e mortalidade característico da doença em humanos. Para reprodução semelhante desses sinais e sintomas utiliza-se modelo de sepse abdominal, sepse cutânea, sepse induzida pela administração de LPS ou TNF. Porém o modelo animal mais aceito na literatura por simular mais adequadamente o quadro clínico de sepse é o chamado *Cecal Ligation Puncture* (CLP).^{25,102-104}

Segundo Witchterman, Baue e Chaudry, CLP é a técnica baseada na ligação do ceco abaixo da válvula íleo cecal, perfuração do ceco e extravasamento do conteúdo fecal para a cavidade peritoneal.¹⁰⁶ Assim, além de peritonite, ocorre a indução também de

isquemia mesentérica, simulando dessa forma quadros clínicos relacionados a sepse abdominal (isquemia mesentérica, apendicite, etc.).¹⁰⁷

O método CLP é simples, reprodutível e existe a possibilidade de controlar o grau de contaminação bacteriana na cavidade peritoneal, e consequentemente, a mortalidade, pelo tamanho da agulha ou número de perfurações realizadas no ceco.¹⁰²⁻¹⁰⁵

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a suscetibilidade a encefalopatia séptica em ratos obesos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o peso, índice de Lee (IMC) e o consumo alimentar em ratos obesos e submetidos ao modelo animal de sepse severa;
- Quantificar a permeabilidade da BHE no hipocampo, córtex, córtex pré-frontal de ratos obesos e submetidos ao modelo animal de sepse severa por CLP;
- Avaliar os níveis de mieloperoxidase (MPO) no hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de ratos obesos e submetidos ao modelo animal de sepse severa por CLP;
- Avaliar a concentração de nitrito/nitrato no hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de ratos obesos e submetidos ao modelo animal de sepse severa por CLP;
- Avaliar os níveis de dano oxidativo em lipídios e proteínas no hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de ratos obesos e submetidos ao modelo animal de sepse severa por CLP;
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de ratos obesos e submetidos ao modelo animal de sepse severa por CLP.

3 ETAPAS METODOLÓGICAS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 170 ratos machos, pertencentes à linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com idade de 60 dias, pesando entre 250-300g, procedentes do Biotério da Universidade do Vale do Itajaí, campus Itajaí – Santa Catarina. Os animais foram alojados em grupos de 3 a 5 por gaiola, sendo identificados através de marcações na cauda. O ambiente dispõe de ar condicionado que mantém a temperatura a $22^{\circ}\pm 1$ e sistema de iluminação que garante 12 horas de ambiente claro e 12 horas de ambiente escuro. O número de animais em cada grupo foi baseado na literatura, para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias calculou-se um tamanho de amostra, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto de pesquisa foi submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina e aprovado sob o protocolo nº 13.026.4.03.IV. 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 (CONCEA, 2013).¹⁰⁸

3.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO

O procedimento experimental foi realizado no Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental da UNISUL, Tubarão, Bloco da Saúde.

3.4 MODELO ANIMAL

3.4.1 Indução de obesidade

Durante dois meses os animais receberam ração normocalórica Nuvilab CR-1 (eutróficos) ou foram induzidos à obesidade através da alimentação hipercalórica previamente

padronizada por Estadella, contendo por peso 19 % de proteína, 47 % de carboidrato, 16 % de lipídeos, 3 % de celulose, 5 % de vitaminas e minerais com 4,79 kcal/g. Os ingredientes foram moídos e misturados na forma de pelets, na seguinte proporção: 15 g de ração normocalórica Nuvilab CR-1 (3,78 kcal/g); 10 g de amendoim torrado (5,95 kcal/g); 10 g de chocolate ao leite (5,4 kcal/g) e 5 g de bolacha maizena (4,25 kcal/g).¹⁰⁹ Os animais foram divididos em 70 animais submetidos a dieta padrão (eutróficos) e 100 animais submetidos a dieta hipercalórica (obesidade). Durante o experimento, os animais foram pesados uma vez por semana e a ingesta alimentar foi mensurada diariamente. O consumo alimentar foi calculado por meio da diferença entre a ração ofertada e as sobras e feito uma média semanal e posteriormente total. Para o cálculo da evolução da massa corporal foi utilizado o Índice de Lee, que baseia-se no cálculo da raiz cúbica da massa corporal (g), dividido pelo comprimento naso-anal (cm).¹¹⁰

3.4.2 Indução de sepse

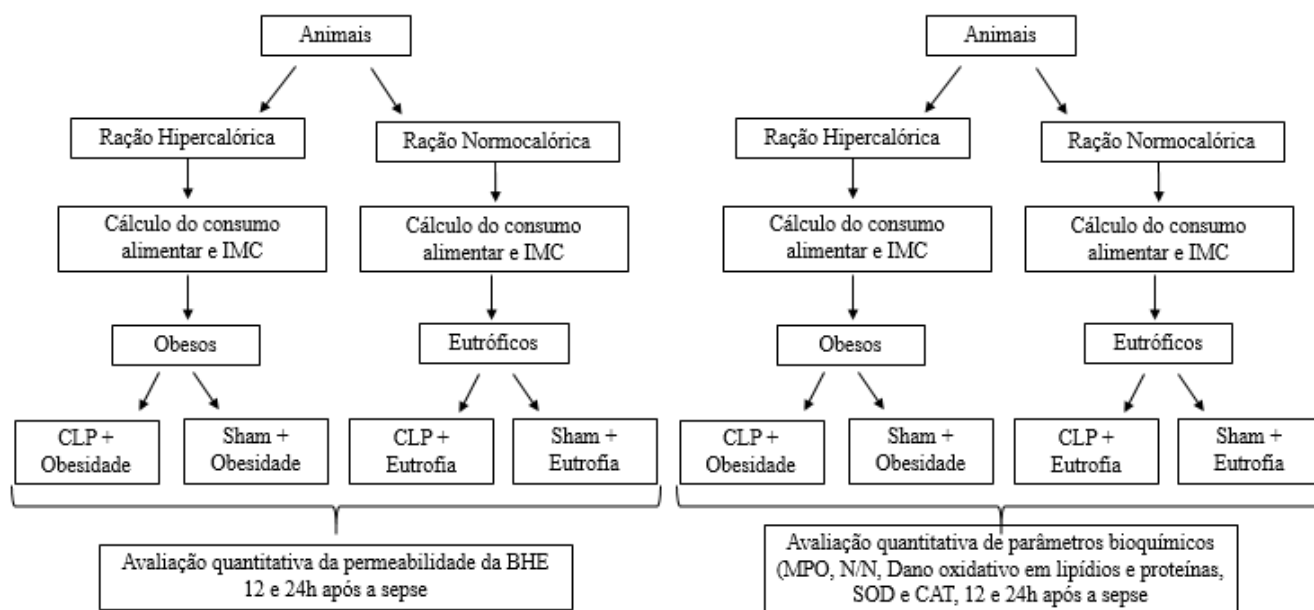
A sepse foi mimetizada no animal através da técnica de CLP, para submissão da técnica os animais foram primeiramente anestesiados com cetamina (80 mg/Kg) e cloridrato de xilasina (10 mg/Kg) intraperitoneal, e foram submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal. O ceco foi ligado logo abaixo da junção íleo-cecal com fio seda 3-0, mantendo assim a continuidade intestinal. O ceco foi então perfurado com uma agulha número 14 na face antimesentérica foi comprimido até a extrusão de conteúdo fecal. Os planos cirúrgicos foram fechados e os ratos foram observados em caixa de recuperação. Como controle utilizou-se animais submetidos a laparotomia, com manipulação do ceco, mas sem ligação ou perfuração (sham). Os grupos recebem reposição volêmica com salina, 50 mL/kg, imediatamente e 12 horas após a cirurgia e ceftriaxona 30 mg / kg e clindamicina 25mg / kg por via subcutânea a cada 6 horas. Ainda, após o procedimento cirúrgico os animais receberam 80 mg/kg de dipirona sódica (i.m) para analgesia.¹¹¹

3.4.3 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram divididos em Sham (controle) + Eutrofia, Sham + Obesidade, CLP + Eutrofia e CLP + Obesidade (Figura 2). Após a indução de obesidade e, posteriormente, de sepse, 1:30 h antes do tempos de eutanásia que foram de 12 e 24h após a cirurgia, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/Kg) e cloridrato de xilasina (10

mg/Kg) intraperitoneal, e 20 mg / kg de corante azul de Evans a 2 % (1 mL / kg) foi injetado através da artéria femoral. No tempo de 1:30 h após a administração do corante, o tórax foi aberto e a aorta descendente foi cortada. Em seguida, de 200-300 mL de solução salina foi infundida no interior do ventrículo esquerdo para remover o corante azul de Evans intravascular. Para este efeito, a veia jugular foi cortada bilateralmente e a infusão foi continuada até a remoção completa do corante azul de Evans. Em seguida, o hipocampo, córtex e córtex pré-frontal foram removidos de imediato e pesados, seguido de homogeneização.¹¹² Em outro experimento os animais foram submetidos a obesidade e 12 e 24 horas após a sepse foram mortos por decapitação e retirado o hipocampo, córtex e córtex pré-frontal para avaliação dos outros parâmetros bioquímicos conforme demonstrado na figura 2.

Figura 2: Desenho experimental do estudo proposto.



Fonte: Autora, 2014.

3.5 ANÁLISES

3.5.1. Permeabilidade da barreira hematoencefálica (n=7 por grupo)

A avaliação quantitativa da ruptura da BHE foi investigada nos tempos de 12 e 24h após a indução de sepse através da determinação espectrofotométrica da quantidade de azul de evans extravasado para o parênquima cerebral por intensidade de fluorescência

(nanogramas de azul de evans por miligrama de tecido cerebral) em leitor de microplacas a 620 nm.¹¹³

3.5.2. Concentração de nitrito/nitrato (n=7 por grupo)

A concentração de nitrito/nitrato foi mensurada no hipocampo, córtex e córtex pré-frontal dos animais utilizando a reação de Griess, por adição de 100 µL de reagente de Griess [0,1 % (w/v) em H₂O e 1 % (w/v) de sulfanilamida em 5 % (v/v) de H₃PO₄ concentrado, vol. [1:1] para a 100 µl da amostra.¹¹⁴ A concentração de nitrito/nitrato foi avaliada em espectrofotômetro em 550 nm e mensurada em concentração de nitrito/nitrato (nmol/mg de proteína).

3.5.3. Atividade da mieloperoxidase (MPO) (n=7 por grupo)

A atividade da MPO foi avaliada como indicativo do infiltrado de neutrófilos. As amostras foram homogeneizadas em brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5 % e centrifugado a 15.000 x g durante 40 min. Uma alíquota de sobrenadante foi misturado com uma solução de 1,6 tetrametilbenzidina mM e 1 mM de H₂O₂. A atividade foi medida, espectrofotometricamente, com o comprimento de onda à 650 nm a 37°C e quantificada em atividade de MPO (U/mg proteína).¹¹⁵

3.5.4. Dano oxidativo em lipídios e proteínas (n=7 por grupo)

A formação TBARS durante uma reação ácido-aquecimento é amplamente adotado como um método sensível para a medição da peroxidação lipídica.¹¹⁶ Resumidamente, as amostras do tecido cerebral foram homogeneizadas e misturadas com 1 mL de ácido tricloroacético 10 % e 1 mL de TBA 0,67 %. Subsequentemente, estes foram aquecidos em banho de água a 100° C durante 30 min. O equivalente de malondialdeído (MDA) foi determinado pela absorbância de 532 nm usando 1,1,3,3 - tetrametoxipropano como um padrão externo. Os resultados serão expressos como equivalentes de MDA (nmol/mg de proteína).

O efeito do estresse oxidativo em proteínas foi avaliado por meio da determinação de grupamentos carbonilas baseada na reação com dinitrofenilhidrazina.¹¹⁷ Resumidamente, as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20 % e dissolvidas em

dinitrofenilhidrazina, e a absorbância foi avaliada em 370 nm. Os resultados foram expressos como nmol de proteínas carboniladas por mg de proteína.

3.5.5. Atividade da Superóxido Dismutase e Catalase (n=7 por grupo)

A atividade das enzimas antioxidantes foram aferidas conforme previamente descrito.^{118,119} A atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio em 240 nm através do espectrofotômetro e a atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente em 470 nm conforme previamente descrito. A CAT foi expressa como atividade de CAT em U/mg de proteína e a atividade da SOD foi avaliada em atividade da SOD em U/mg de proteína.

3.5.6 Quantificação de proteínas (n=7 por grupo)

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método descrito por Lowry et al., e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão e mensurada em espectrofotômetro e expressa em mg proteína.¹²⁰

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados apresentados foram avaliados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste post hoc Tukey ou pelo teste *t* Student. A análise estatística foi realizada através do programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS). A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação de Peso, Índice de Lee e Consumo Alimentar

Conforme a Tabela 1, quando avaliamos os parametros de obesidade, verificamos que os animais submetidos a dieta hipercalorica tiveram um peso final, significativamente, maior que os animais que receberam a dieta normocalórica. Não verificamos diferença quanto ao comprimento naso-anal no entanto observamos um aumento significativo do índice de Lee quando os animais foram submetidos a dieta hipercalórica.

Em relação ao consumo alimentar diário, não observamos diferença significativa comparando-se os dois grupos.

Tabela 1. Peso final total, comprimento naso-anal, índice de Lee e consumo alimentar de ratos Wistar machos submetidos a dieta hipercalorica comparados com ratos que receberam dieta normocalórica por 60 dias.

Dieta	Normocalórica	Hipercalórica
Peso final (g)	317,48±3,35	427,92±7,82 *
Comprimento naso-anal (cm)	19,06±0,17	19,51±0,16
Índice de Lee	0,355±0,0038	0,394±0,0028*
Consumo alimentar (g/dia)	23,32±0,12	21,07±0,15

Fonte: Autora, 2014.

Valores foram expresso como media ± EM. * p < 0.05 (t-test Student's).

4.2 Permeabilidade da barreira hematoencefálica

Os gráficos 1A e 1B representa os resultados de permeabilidade da BHE pela técnica de extravasamento de azul de evans 12 e 24 horas após CLP ou Sham, em animais eutrofos e induzidos a obesidade. Até 12 horas após a indução, verificou-se um aumento da permeabilidade BHE no hipocampo e no córtex pré-frontal apenas no CLP + obesidade em comparação com Sham + eutrofia, como mostrado no gráfico 1A. Nas 24 horas após a cirurgia CLP, pode-se observar um aumento de extravasamento de azul evans no CLP + eutrofia comparando-se com Sham + eutrofia e CLP + obesidade foi efetivo em contribuir pelo aumento desses níveis comparando-se com Sham+obesidade e CLP + eutrofia no hipocampo e no córtex (Gráfico 1B).

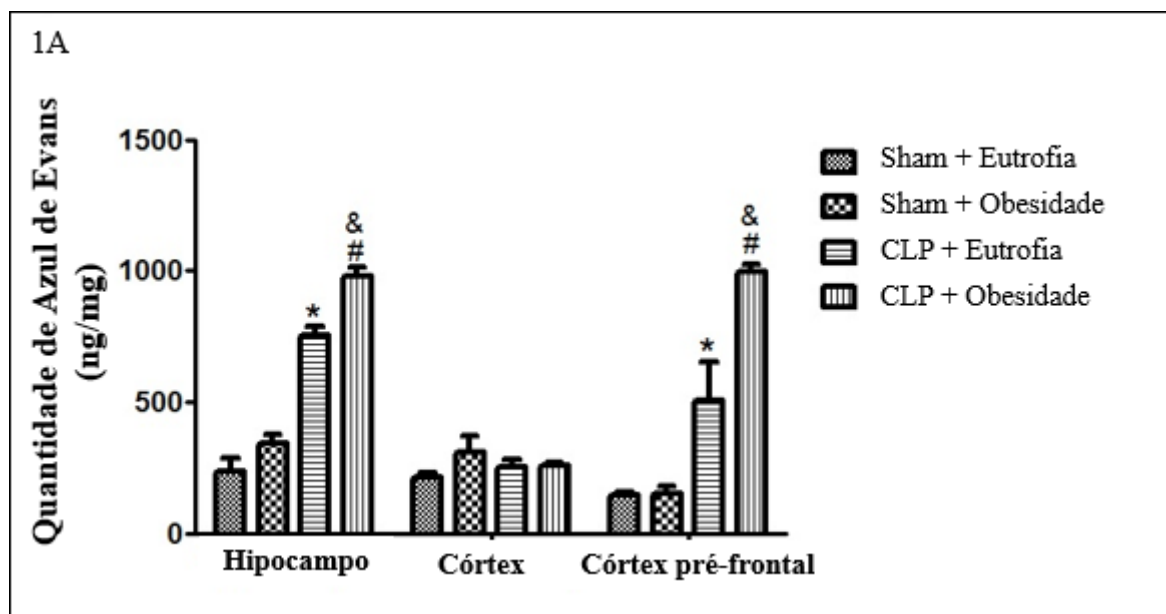


Gráfico 1A: Avaliação de quebra de BHE em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (12 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.

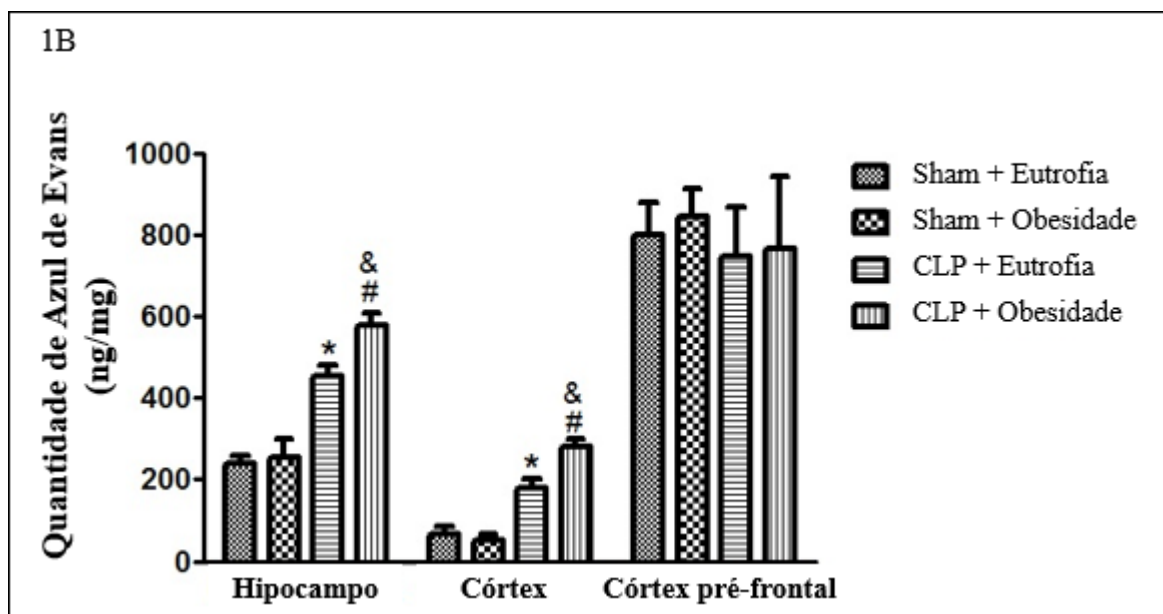


Gráfico 1B: Avaliação de quebra de BHE em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (24 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.

4.3 Atividade da mieloperoxidase e concentração de nitrito/nitrato

A resposta inflamatória pode ser avaliada pela quantidade de infiltrado de neutrófilos e para isso utilizou-se a técnica de atividade da MPO. Quanto a concentração de

nitrito/nitrato utilizou-se como indicativo de formação de ON no hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de ratos obesos ou eutróficos submetidos ao modelo CLP ou sham. Com relação a esses dois parâmetros observou-se o aumento apenas no hipocampo no grupo CLP + obesidade em comparação com Sham + obesidade 12 horas após a cirurgia de CLP (Gráfico 2A e 3A respectivamente).

Quanto a análise feita 24 horas após a indução da sepse, os níveis de MPO e concentração de nitrito/nitrato foram aumentados no hipocampo e no córtex do CLP + eutrofia e os parametros observados foram potencializados quando os animais foram submetidos a CLP + obesidade (Gráfico 2B e 3B respectivamente).

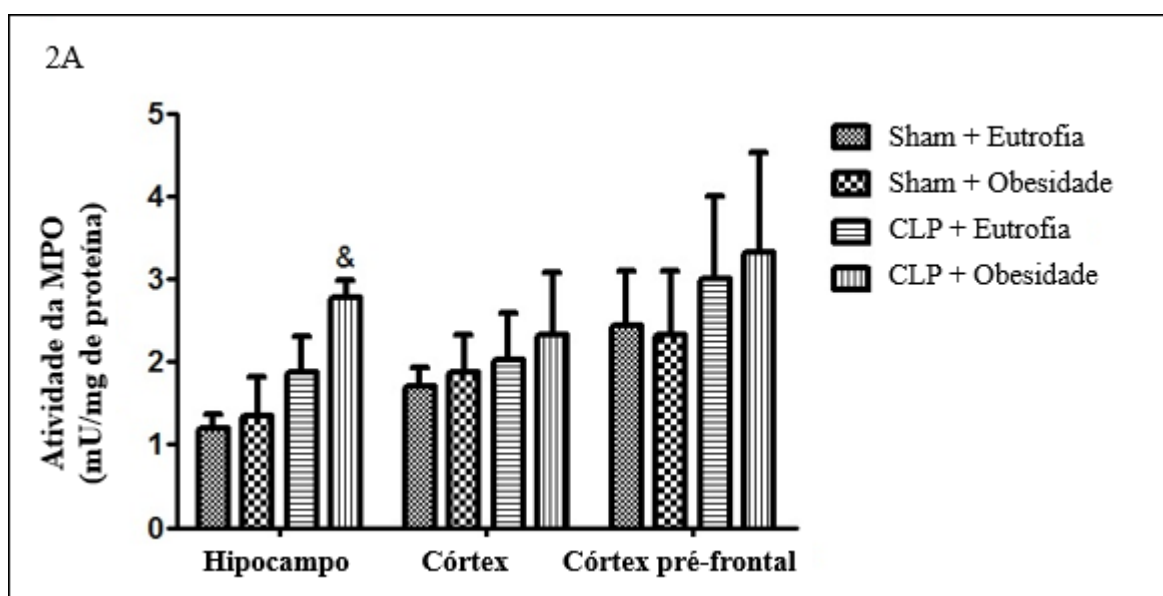


Gráfico 2A: Avaliação da atividade da MPO em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (12 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.

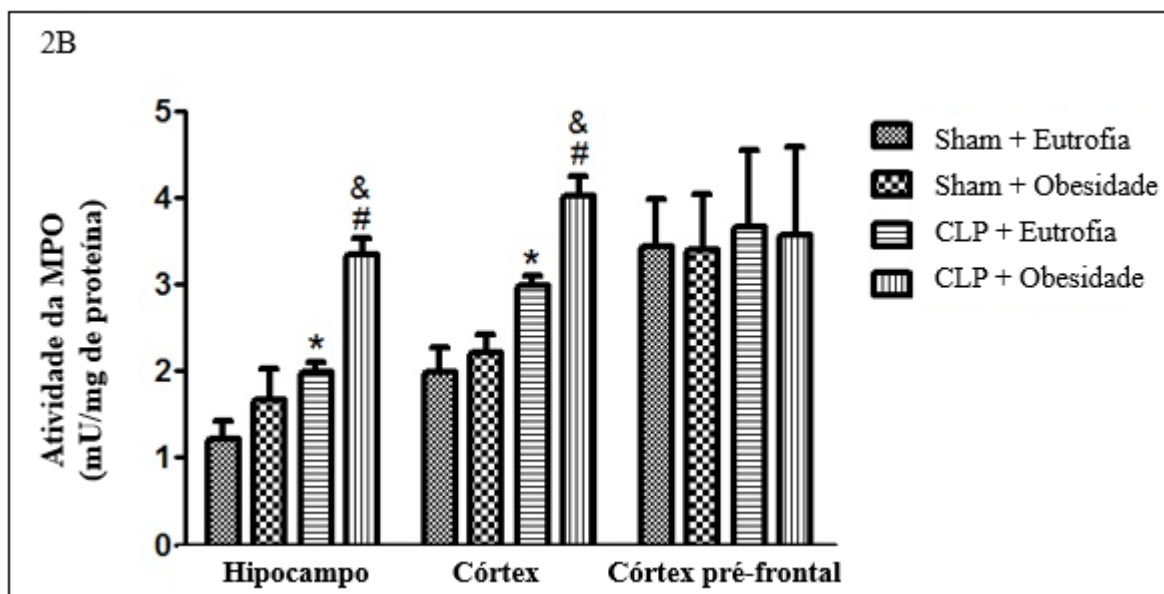


Gráfico 2B: Avaliação da atividade da MPO em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (24 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.

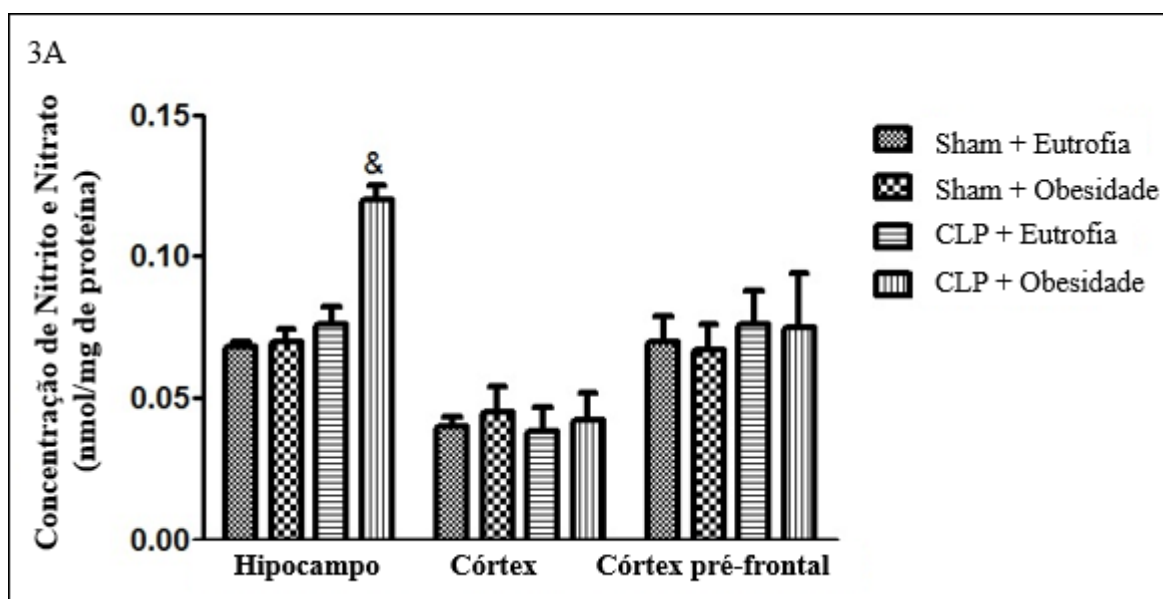


Gráfico 3A: Avaliação da concentração de nítrito e nitrato em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (12 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.

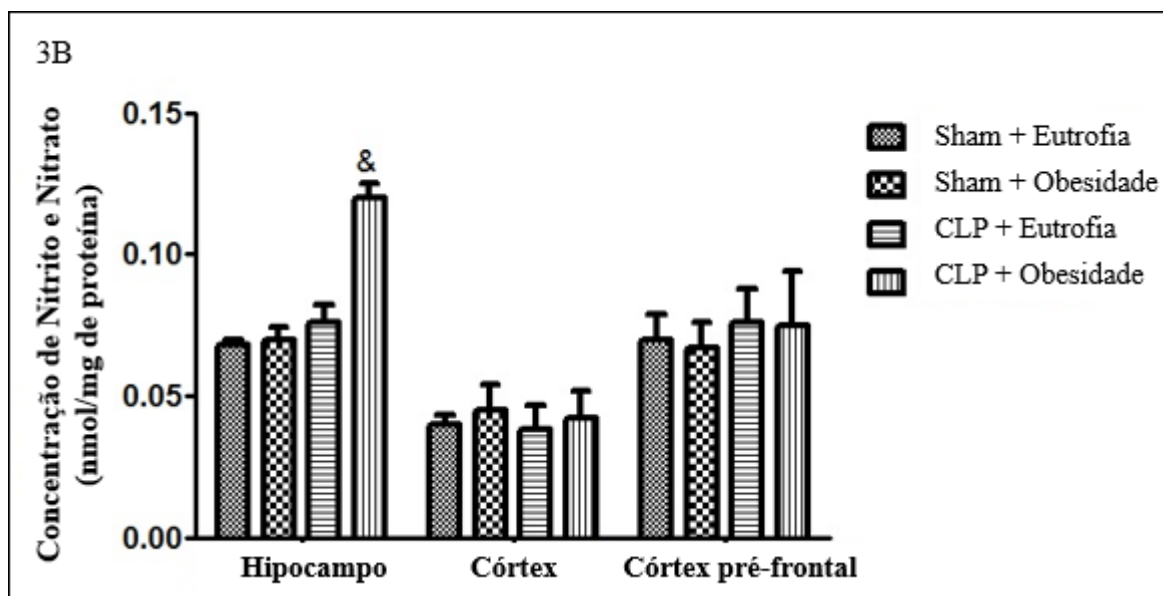


Gráfico 3B: Avaliação da concentração de nitrito e nitrato em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (24 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.

4.4 Estresse oxidativo: TBARS e Carbonilação de proteínas

Verificou-se um aumento nos níveis de dano oxidativo em 12 horas após CLP no grupo CLP + obesidade com relação ao grupo CLP + eutrofia e Sham + obesidade no hipocampo e no córtex como mostrado no Gráfico 4A. Enquanto que no tempo de 24 horas após CLP, houve aumento da peroxidação lipídica em todas as estruturas cerebrais estudadas no grupo CLP + eutrofia em comparação com Sham + eutrofia e o grupo CLP + obesidade exacerbou essa resposta comparado ao grupo Sham+obesidade e CLP + eutrofia (Gráfico 4B).

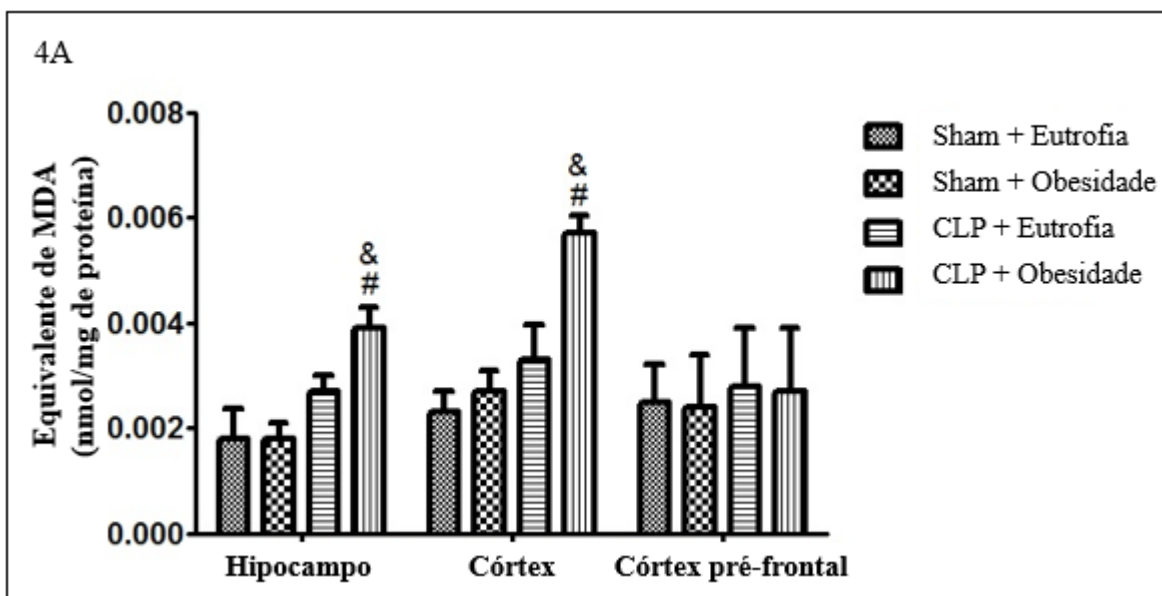


Gráfico 4A: Equivalente de MDA em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (12 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.

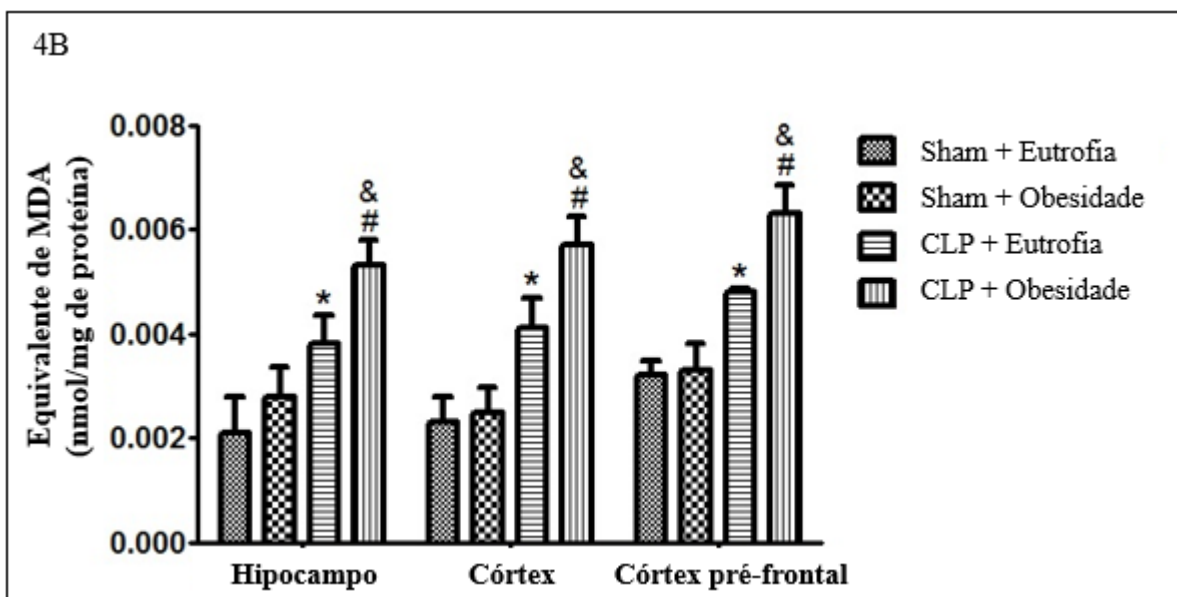


Gráfico 4B: Equivalente de MDA em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (24 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.

Com relação a avaliação ao dano oxidativo em proteínas através da carbonilação proteica, verificou-se que os resultados não foram significativos nas primeiras horas após a indução da obesidade e sepse (Gráfico 5A). No entanto, observa-se um aumento na carbonilação de proteínas nos grupos CLP + eutrofia em comparação com Sham + eutrofia e

no grupo CLP + obesidade em comparação com Sham + obesidade e CLP + eutrofia no hipocampo e no córtex 24 horas após a cirurgia (Gráfico 5B).

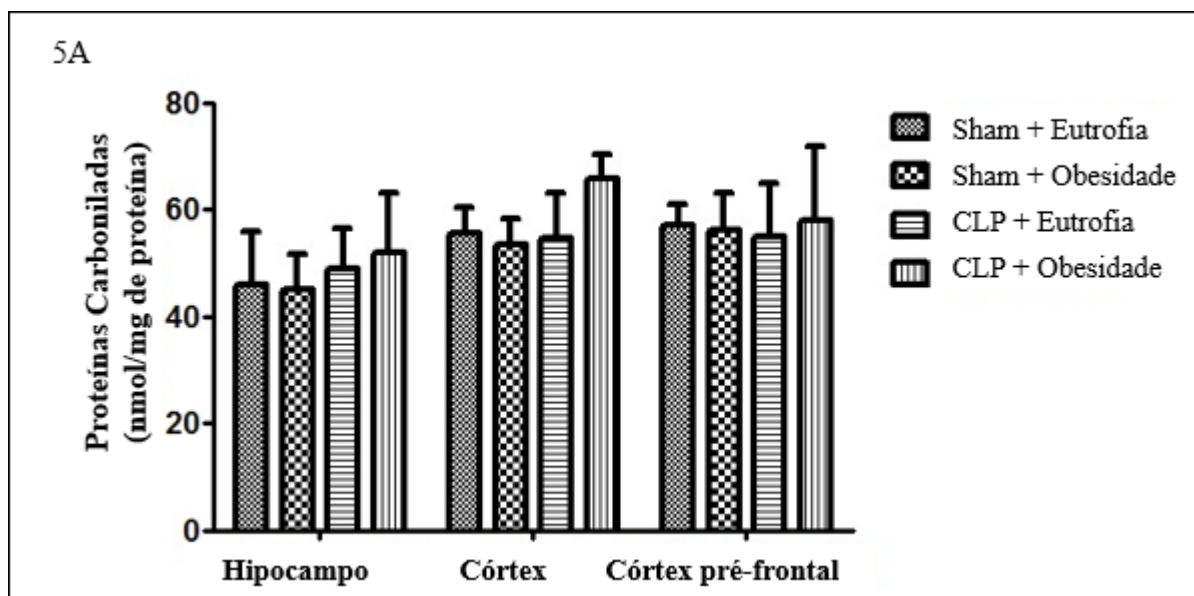


Gráfico 5A: Proteínas carboniladas em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (12 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.

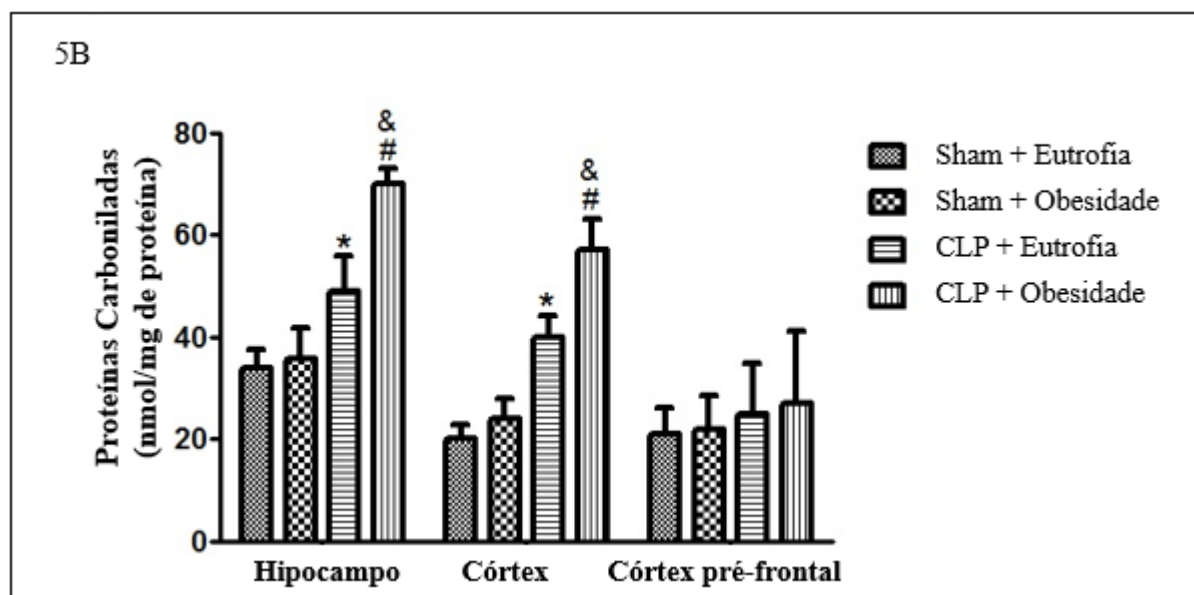


Gráfico 5B: Proteínas carboniladas em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (24 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.

4.5 Atividade antioxidante

A atividade da SOD e CAT não foram significativas em 12 horas após a cirurgia, como mostrado no Gráfico 6A e 6C respectivamente. Quanto às 24 horas após a indução a sepse, observou-se uma diminuição da atividade da SOD no CLP + eutrofia em comparação com Sham + eutrofia com potencialização da diminuição da SOD no grupo CLP + obesidade em comparação com CLP + eutrofia e Sham + obesidade em todas as estruturas cerebrais estudadas (Gráfico 6B). A atividade de CAT nas 24 horas foi reduzida apenas no hipocampo no grupo CLP + eutrofia e essa queda foi potencializada no grupo CLP + obesidade (Gráfico 6D).

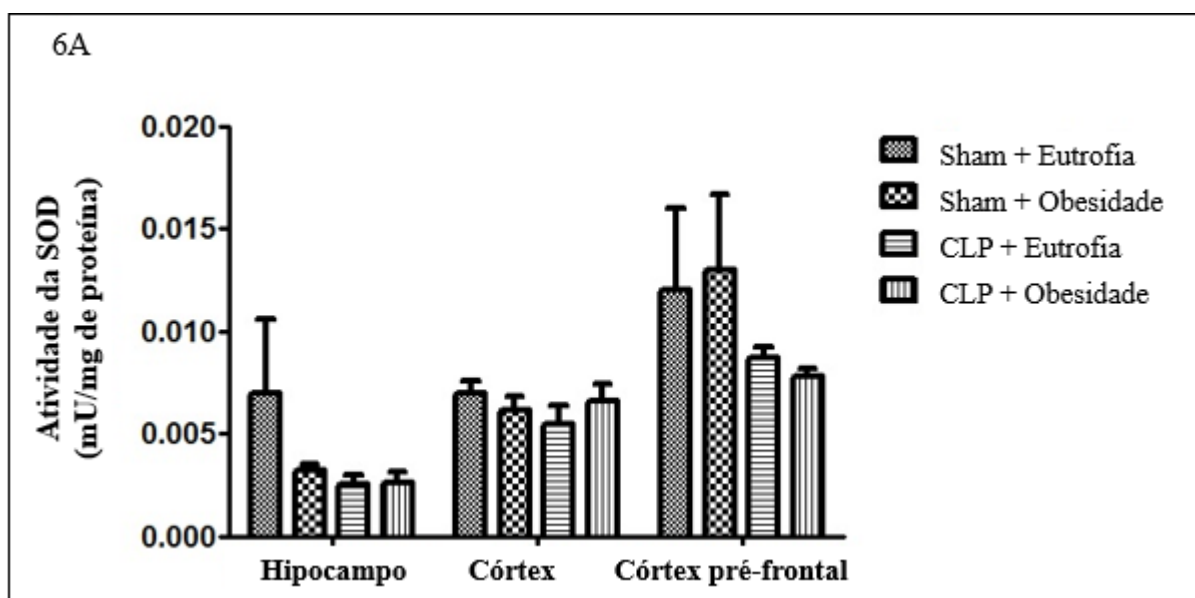


Gráfico 6A: Atividade da SOD em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (12 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.

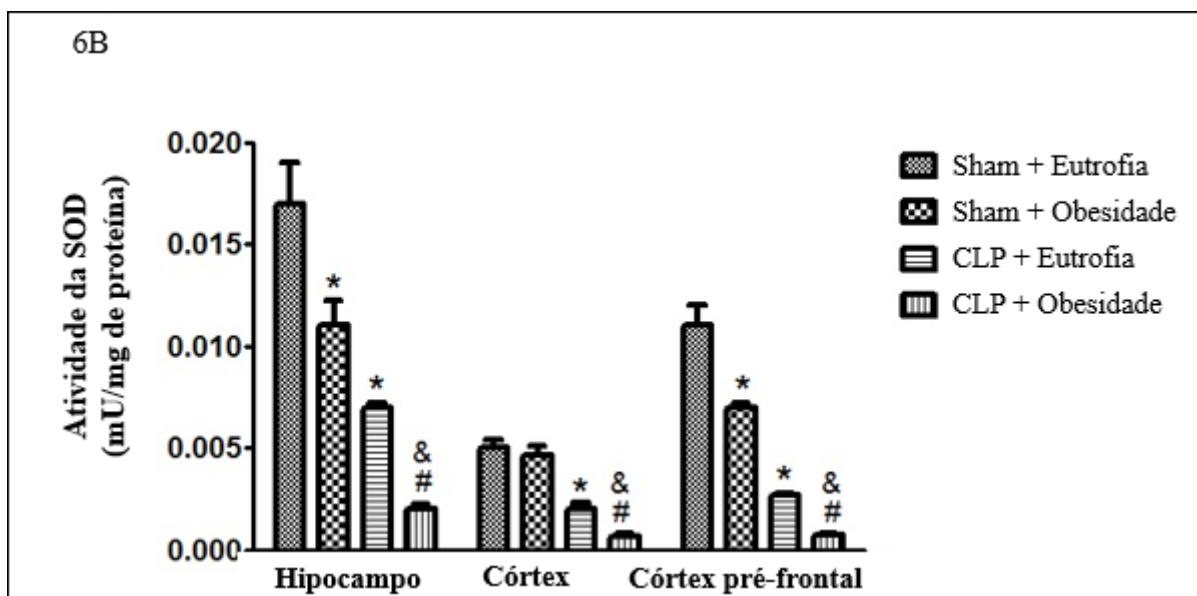


Gráfico 6B: Atividade da SOD em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (24 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.

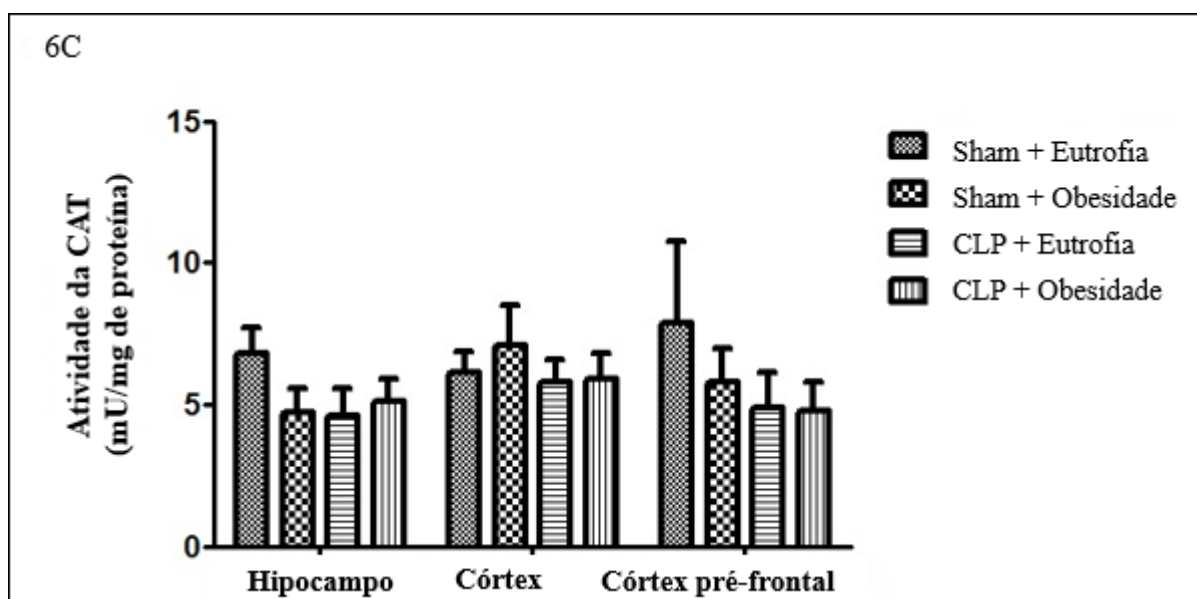
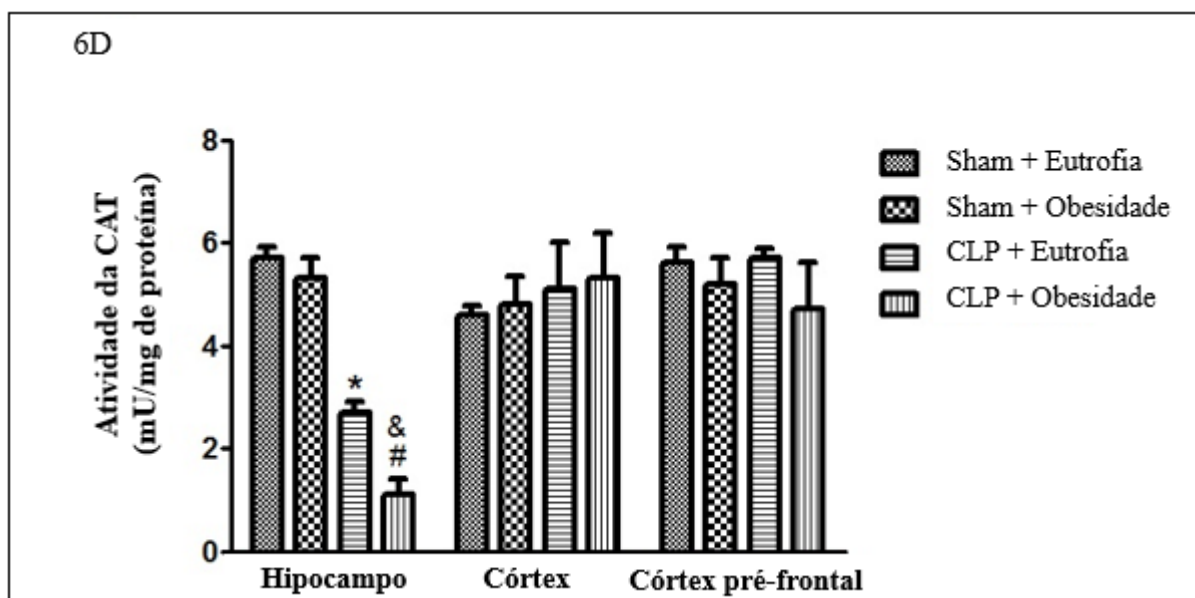


Gráfico 6C: Atividade da CAT em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (12 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.



6D: Atividade da CAT em hipocampo, córtex e córtex pré-frontal de animais obesos e eutróficos submetidos a sham ou CLP (24 horas). * Significativo em relação a Sham + Eutrofia; & Significativo em relação a Sham + Obesidade; # Significativo em relação a CLP + Eutrofia, considerando $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou a influência da obesidade sobre a lesão cerebral após a indução de sepse em ratos. Os dados encontrados indicam que nos ratos obesos e submetidos a sepse polimicrobiana, ocorre um aumento de permeabilidade da BHE em diferentes regiões cerebrais em comparação com ratos eutróficos sépticos. Essa alteração refletiu sobre a migração de neutrófilos, concentração de nitrito/nitrato, dano oxidativo em lipídios e proteínas e um desequilíbrio das defesas antioxidantes, especialmente, em 24 horas após a sepse. Esses resultados sugerem fortemente que animais obesos são de fato mais vulneráveis aos efeitos deletérios da sepse no cérebro.

A obesidade, devido ao seu fenótipo pró-inflamatório acompanhada da resistência à insulina, favorece um ambiente em que estímulos inflamatórios adicionais conduzem a uma resposta inflamatória exagerada.¹²¹ Evidências clínicas apontam a obesidade como fator de risco para disfunção de múltiplos órgãos induzida por sepse, e o cérebro é um dos primeiros órgãos afetados durante o desenvolvimento da doença.^{122,123}

Com base na literatura sabe-se que a ES em pacientes e em diferentes modelos animais de sepse, ocorre como resultado da resposta pró-inflamatória e alterações na BHE, que possibilitam que células inflamatórias tenham acesso ao cérebro e liberem materiais tóxicos resultando no dano neuronal.¹²⁴ Nesse contexto, no presente estudo podemos verificar um aumento na permeabilidade BHE e nos níveis de MPO, como marcador de infiltrado de neutrófilos, apenas no hipocampo e no córtex 24 horas após CLP, como previamente demonstrado.⁴⁸ Estudos pré-clínicos mostram que em ratos obesos verifica-se uma quantidade exagerada de citocinas inflamatórias circulantes, derivadas do tecido adiposo e aumento de interações de células circulantes com células endoteliais via aumento da expressão de moléculas de adesão na microcirculação cerebral durante a sepse por CLP, em comparação com os ratos eutróficos.^{95,125,126} Evidenciamos portanto, que a sepse associada ao quadro de obesidade em ratos, favorece a uma significativa disfunção BHE e aumento da infiltração de neutrófilos no hipocampo já em 12 horas, sendo que essa resposta passa a ser potencializada no hipocampo e no córtex 24 h após CLP. Assim, podemos ter como resultado nessa etapa do estudo a resposta para a hipótese de que a inflamação relacionada com fisiopatologia da obesidade acelera e potencializa a disfunção da BHE e o acesso de neutrófilos ativados para o cérebro em ratos submetidos a sepse.

Os mecanismos relacionados ao aumento da permeabilidade na BHE na sepse em ratos é multifacetado e pode envolver o aumento do estresse oxidativo e alterações nas JA,

componentes estruturais essenciais da BHE.^{48,59} Tem sido documentado que as células endoteliais vasculares cerebrais possuem maior quantidade de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidreto (NADPH) oxidase e, portanto, pode resultar em uma maior produção de EROs e ERNs,¹²⁷ contribuindo potencialmente para a disfunção da BHE. O peroxinitrito, como produto da reação do anion superóxido com óxido nítrico (NO), gerados por NADPH oxidase e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), respectivamente, tem sido proposto como um contribuinte para a morte celular e dano tecidual na sepse^{128,129} e, em especial ao dano cerebral.¹³⁰ Seguindo o aumento da permeabilidade da BHE e infiltrado de neutrófilos encontramos em nosso estudo um aumento de nitrito/nitrato como produto final de ON somente em 24 horas após CLP, no hipocampo e cortex. Recentemente, verificamos que em modelo animal de sepse ocorreu um aumento da produção de nitrito/nitrato em diferentes estruturas cerebrais quando os animais foram submetidos a uma condição inflamatória crônica como ao modelo animal de diabetes por aloxano.¹³¹ Nesse sentido, no presente estudo, verificamos que assim como em modelo de diabetes, como uma condição previamente inflamatória, a obesidade associada aumentou os níveis de nitrito/nitrato desde 12 h e potencializado em 24 horas após a sepse no hipocampo e no córtex dos animais.

O tecido cerebral tem características únicas que o torna mais suscetível ao dano oxidativo devido a uma alta taxa metabólica de oxigênio e níveis baixos de defesas antioxidantes em comparação com outros órgãos.¹³² Estudos experimentais e clínicos demonstram que a disfunção de múltiplos órgãos na sepse está associada a um aumento da produção de EROs e depleção de antioxidantes, levando ao estresse oxidativo.¹³³ EROs geradas durante a resposta inflamatória sistêmica inicia a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas no cérebro e parênquima cerebral, devido a falência dos sistemas antioxidantes do cérebro. Isto prejudica o metabolismo oxidativo cerebral e provoca uma supressão aguda da função cerebral global, que, em seguida, dá origem aos sintomas característicos da ES.¹²⁹ Estas observações ocorrem já no início do curso do desenvolvimento da sepse⁵⁶ e a associação de antioxidantes em estudos previos atenuou o dano oxidativo no hipocampo e córtex.^{134,135} Verificamos em nosso estudo, resultados que reforçam essas observações, quando os animais foram submetidos a sepse houve aumento de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas no hipocampo e no córtex em 24 horas após CLP.

O SNC pode também ser prejudicialmente afetado pela obesidade associada a disfunção metabólica e o estresse oxidativo.¹³⁶ Tem-se demonstrado que uma dieta rica em gordura aumenta o nível de peroxidação lipídica no cérebro em ratos.¹³⁷ Assim, no presente estudo mostramos que a obesidade induziu um aumento da carbonilação de proteínas em 24

horas e lipoperoxidação em 12 horas e 24 horas após cirurgia de CLP, principalmente no hipocampo e no córtex em proporções maiores do que o dano oxidativo causado somente por sepse. O fato de que os lipídios foram mais afetados do que as proteínas, pode ser devido ao cérebro possuir uma maior concentração e diversidade de lipídios,^{138, 139} sendo mais sensível a peroxidação lipídica tornando o cérebro particularmente vulnerável ao estresse oxidativo¹⁴⁰

Uma vez que o estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes do tecido e as espécies reativas geradas, os resultados encontrados neste estudo indicam fortemente que a obesidade potencializa a diminuição da atividade da CAT e SOD em ratos sépticos. Estas observações foram verificadas em todas as estruturas cerebrais estudadas quando avaliamos a atividade da SOD e apenas no hipocampo para a atividade da CAT. Níveis relativamente baixos destas enzimas podem ser responsáveis, em parte, pela vulnerabilidade do tecido cerebral, bem como verificamos em nosso estudo. Alzoubi et al., mostraram que o consumo de dieta rica em gordura e em carboidratos reduzem a atividade das enzimas SOD e CAT no hipocampo e córtex, resultando no deficit de memória de curta e longa duração.¹⁴¹ Com base em estudos prévios de que o desequilíbrio de antioxidantes pode contribuir para o dano oxidativo em regiões cerebrais que associam-se a alterações cognitivas na sepse e obesidade isoladamente,¹⁴¹⁻¹⁴³ verificamos em nosso estudo uma potencialização do deficit das enzimas antioxidantes quando a obesidade e sepse foram associadas o que poderia estar associado a um possível aumento de dano cognitivo nesses animais.

Finalmente, podemos dizer que os animais obesos tornam-se de fato mais vulneráveis aos efeitos deletérios da sepse referentes ao dano cerebral resultante do aumento da permeabilidade da BHE, infiltrado de neutrófilos, o dano oxidativo e os baixos níveis de enzimas antioxidantes, o que torna-se um importante foco de futuras investigações.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a associação de um modelo animal de obesidade e sepse polimicrobiótica, afim de identificar possível exacerbação da resposta inflamatória presente na sepse. Os dados encontrados indicam que em ratos obesos e submetidos a sepse ocorre um aumento da permeabilidade da BHE em diferentes regiões cerebrais em comparação com ratos eutróficos sépticos. Essa alteração refletiu sobre a migração de neutrófilos, concentração de nitrito/nitrato, dano oxidativo em lipídios e proteínas e um desequilíbrio das defesas antioxidantes especialmente 24 horas após a sepse.

Portanto, considerando a elevada prevalência de sepse e o desenvolvimento da encefalopatia séptica e a sua correlação com o quadro de inflamação crônica característico da obesidade e que este estudo trata-se de um projeto inicial, torna-se extremamente importante estudos mais específicos sobre o tema, proporcionando assim uma maior compreensão dos fatores neuroquímicos e neuroinflamatórios envolvidos entre sepse, mais precisamente a encefalopatia séptica e a obesidade e que poderá contribuir para o desenvolvimento de terapias específicas no tratamento do dano neurológico no quadro de sepse e obesidade associadas.

REFERÊNCIAS

1. Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent JL, Cohen J, Opal SM, et al. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Crit Care Med*. 2000; 28: 232-5.
2. 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. *Car Med. Chest* 1992; 101: 1644-55.
3. Finfer S, Bellomo R, Lipman J, French C, Dobb G, Myburgh J. Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30: 589-96.
4. Padkin A, Goldfrad C, Brady AR, Young D, Black N, Rowan K. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. *Crit Care Med* 2003; 31: 2332-8.
5. Medzhitov R, Janeway J C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immuno Rev*. 2000; 173: 89–97.
6. David CMN. Sepsis e síndrome da disfunção orgânica múltipla. In: AMIB/Cid Marcos. *Rev. Medicina Intensiva*. 2004; 563 p.
7. Pereira Júnior GAP, Marson F, Abeid M, Ostini FM, Souza SH, Basile-Filho. A fisiopatologia da sepsis e suas implicações terapêuticas. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 1998; 31: 349-62.
8. Henkin CS, Coelho JC, Paganella MC, de Siqueira RM, Dias FS. Sepsis: uma visão atual. *Rev Scientia Medica*. 2009; 19:135-45.
9. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoine MH, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA*. 1995; 274: 639-44.
10. Oliveira A, Werli A, Paula A, Bras N, Sala S. Infecções hospitalares em uma unidade de internação de um hospital universitário. *J Nurs UFPE*. 2007; 1(2): 220-4.
11. Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief*. 2011;(62):1-8.
12. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virul*. 2014; 5(1): 4–11.
13. ILAS-Instituto Latino Americano de Sepsis. Campanha Sobrevivendo à Sepsis: Relatório Nacional Trimestral. *Surviving Sepsis Campaign*, São Paulo, 2014.

14. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. Epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003; 348:1546-54.
15. Rangel-Frausto MS. Sepsis: still going strong. *Arch of Med Res*. 2005; 36: 672-681
16. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med*, 2001; 29:109-16.
17. Karima, R.; Matsumoto, S.; Higashi, H.; Matsushima, K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Molecular Medicine Today*. 1999; 5:123–32.
18. Thijs LG, Hack CE. Time course of cytokine levels in sepsis. *Intensive Care Med*. 1995; 21: 258-63.
19. Flohé SB, Agrawal H, Schmitz D, Gertz M, Flohé S, Schade FU. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J Leukoc Biol*. 2006; 79(3):473-81.
20. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001; 1(2):135-45.
21. Hubacek JA, Stüber F, Fröhlich D, Book M, Wetegrove S, Ritter M, et al. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med*. 2001; 29(3):557-61
22. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med*. 1991; 115: 457-69.
23. Parrilo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Eng J Med*. 1993; 328:1471-77.
24. Mackenzie I, Lever A. Management of sepsis. *Brit Med J*. 2007; .335(7626): 929-32.
25. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol*. 2007; 81:137-43.
26. Vincent JL, Korkut HA. Defining sepsis. *Clin Chest Med*. 2008; 29:585-90.
27. Ringer TM, Axer H, Romeike BF, Zinke J, Brumkhorst F, Witte OW, et al. Neurological sequelae of sepsis: I) Septic encephalopathy. *Open Crit Care Med J*. 2011;4: 2-7.
28. Pytel P, Alexander JJ. Pathogenesis of septic encephalopathy. *Curr Opin Neurol*. 2009; 22(3):283-7.
29. Szatmári S, Végh T, Csomós A, Hallay J, Takács I, Molnár C, et al. Impaired cerebrovascular reactivity in sepsis-associated encephalopathy studied by acetazolamide test. *Crit Care*. 2010; 14(2):1-7.
30. Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, Tighe D, Bennett ED. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med*. 2000; 28(8):3019-24.

31. Sharshar T, Hopkinson NS, Orlikowski D, Annane D. Science review: The brain in sepsis--culprit and victim. *Crit Care*. 2005; 9(1):37-44.
32. Wilson JX, Young GB. Progress in clinical neurosciences: Sepsis-associated encephalopathy: Evolving concepts. *Can J Neurol Sci*. 2003; 30:98-105
33. Macedo RC, Tomasi CD, Giombelli VR, Alves SC, Bristot Mde L, Locks MF, Petronilho F, Grandi C, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Ritter C. Lack of association of S100 β and neuron-specific enolase with mortality in critically ill patients. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013; 35(3):267-270.
34. Ritter C, Miranda AS, Giombelli VR, Tomasi CD, Comim CM, Teixeira AL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels are associated with mortality in critically ill patients even in the absence of brain injury. *Crit Care*. 2012;17:16(6):R234
35. Cruz JN, Tomasi CD, Alves SC, Macedo RC, Giombelli V, Cruz JG, Dal-Pizzol F, Ritter C. The incidence of delirium in patients pretreated with statins who remain in an intensive care unit after cardiac surgery. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2012; 24(1):52-57.
36. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term Cognitive Impairment and Functional Disability Among Survivors of Severe Sepsis. *JAMA*. 2010; 304(16):1787-94.
37. Straver JS, Keunen RWM, Stam CJ. Nonlinear analysis of EEG in septic encephalopathy. *Neurol Res* 1998; 20:100-6.
38. Green R, Scott LK, Minagar A, Conrad S. Sepsis associated encephalopathy (SAE): a review. *Front Biosci*. 2004; 9:1637-41.
39. Marchi N, Cavaglia M, Fazio V, Bhudia S, Hallene K, Janigro D. Peripheral markers of blood-brain barrier damage. *Clin Chim Acta*. 2004; 342: 1- 12.
40. Weiss N; Miller F; Cazaubon S; Couraud P.O. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1788: 842-57.
41. Davson H. Review lecture. The blood-brain barrier. *J Physiol*. 1976; 255(1):1-28.
42. Wiesendanger M. Constantin von Monakow (1853–1930) and Lina Stern (1878–1968): early explorations of the plexus choroideus and the blood-brain-barrier. *Schweizer Archiv für Neuro und Psych*. 2010;161(4):140-4.
43. Banks WA, Erickson MA. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis*. 2010; 37 (1):26-32.
44. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Ver*.2010; 64: 328-63.
45. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: na overview. Structure, regulation and clinical implications. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 1-13.

46. Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol*. 2007; 208(1):1-25.
47. Hawkins B.T.; Davis T.P. The blood-brain barrier neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Res*. 2005; 57: 173-85.
48. 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.
49. 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.
50. Dejana, E, Corada, M. & Lampugnani, M. G. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J*, 1995; 9: 910-18.
51. Gallin JI, Snyderman R. Overview, in *Inflammation - Basic Principles and Clinical Correlates*. Lippincott Williams & Wilkins. 1999.
52. Proost P, Wuyts A, Van Damme J. The role of chemokines in inflammation. *Inter J of Clin & Lab Res*. 1996; 26: 211-23.
53. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*. 2007; 7:678-689.
54. Shami, N.J.I.E.; Moreira, E.A.M. - Licopeno como agente antioxidante. *Nutr*. 2004; 17: 227-36.
55. Finkel, T, Holbrook, N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *J. Nature*. 2000; 408: 239-47.
56. Schafer, F. Q.; Buettner, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biol. Med*. 2001; 30:1191-212.
57. Cassol OJJ, Rezin GT, Petronilho FC, Scaini G, Alves CL, Ferreira GK, et al. Effects of N-acetylcysteine/deferrioxamine, taurine and RC-3095 on respiratory chain complexes and creatine kinase activities in rat brain after sepsis. *Neurochem Res*. 2010; 35(4):515-521.
58. Barichello T, Fortunatto JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, et al. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 2006; 34: 886-889.
59. 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; 37:711-18.

60. Steckert AV, Comim CM, Mina F, Mendonça BP, Domingui D, Ferreira GK, et al. Late brain alterations in sepsis-survivor rats. *Syn*. 2013; 67(11): 786-93.
61. WHO-World Health Organization- Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Technical Report Series n 894, Geneva, 2000.
62. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*. 2001; 104:531-43.
63. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Atenção Básica. Cadernos de Atenção Básica: Obesidade. Brasília. 2006;12.
64. Siqueira RS, Monteiro CA. Amamentação na infância e obesidade na idade escolar em famílias de alto nível socioeconômico. *Revista Saúde Pública*. 2007; 41(1):5-12.
65. Jung RT. Obesity as a disease. *Br Med Bull*. 1997; 53(2):307-21.
66. Terres, NG, Pinheiro RT, Horta BL, Pinheiro KAT, Horta LL. Prevalência e fatores associados ao sobrepeso e à obesidade em adolescentes. *Rev S Púb*. 2006; 40: 627-33.
67. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999-2008. *JAMA*. 2010; 303(3) :235-41.
68. Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF 2008-2009. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Rio de Janeiro. Ministério da Saúde. 2010.
69. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and metaanalysis. *BMC Public Health*. 2009; 9(88):1-20.
70. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004; 92(3):347-55.
71. Antuna-Puente B, Fève B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab*. 2008; 34(1):2-11.
72. Bullo M, Garcia-Lorda P, Megais I, Salas-Salvado J: Systemic inflammation, adipose tissue tumour necrosis factor, and leptina expression. *Obes Res* 2003, 11: 525-31.
73. Wisse B E. The inflammatory síndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 2792-800.
74. Ito H, Ohshima A, Inoue M, Ohto N, Nakasuga K, Kaji Y, Maruyama T, Nishioka K. Weight reduction decreases soluble cellular adhesion molecules in obese women. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002 ; 29:399-404.

75. Arcaro G, Zamboni M, Rossi L, Turcato E, Covi G, Armellini F et al. Body fat distribution predicts the degree of endothelial dysfunction in uncomplicated obesity. In *J. Obes Relat Metab Disord*. 1999; 23 : 936-942.
76. Fonseca-Alanis MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq. Bras Endocrinol Metabol*. 2006; 50 (2):216-29.
77. Kershaw EE, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(6):2548-56.
78. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and Immunity. *Nat Pub Group*. 2006; 6:772-83.
79. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 2000; 437-46.
80. Arnalich F, López J, Codoceo R, Jim nez M, Madero R, Montiel C. Relationship of plasma leptin to plasma cytokines and human survival in sepsis and septic shock. *J Infect Dis*. 1999; 180(3):908-11.
81. Papathanassoglou ED, Moynihan JA, Ackerman MH, Mantzoros CS. Serum leptin levels are higher but are not independently associated with severity or mortality in the multiple organ dysfunction/systemic inflammatory response syndrome: a matched case control and a longitudinal study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001 Feb;54(2):225-33.
82. Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, et al. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 290:1253-61
83. Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Ortega F, Gómez- Ambrosi J, Ricart W, Frühbeck G, Fernández-Real JM. Circulating omentin concentration increases after weight loss. *Nutri & Metab*. 2010; 7(27):1-6.
84. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, et al. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived antiinflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:3815-9.
85. Vachharajani V, Cunningham C, Yoza B, Carson J, Tushar J. Adiponectin-Deficiency Exaggerates Sepsis-Induced Microvascular Dysfunction in the Mouse Brain. *Obes*. 2012; 20: 498-504.
86. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD et al., Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation*. 2003;108: 736–40.
87. Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y et al., Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004; 314: 415–19.

88. Fu Y, Luo L, Luo N, Garvey WT. Proinflammatory cytokine production and insulin sensitivity regulated by overexpression of resistin in 3T3-L1 adipocytes, *Nutr. Metab. (Lond.)*. 2006; 3:28.
89. Bullo M, Salas-Salvado J, Garcia-Lorda P. Adiponectin expression and adipose tissue lipolytic activity in lean and obese women. *Obes Res*. 2005; 15: 382-6.
90. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004; 92(3):347-55.
91. Ruan H, Miles PDG, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, et al. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- α : implications for insulin resistance. *Diab*. 2002; 51:3176-88.
92. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocr*. 2004; 145: 2273–82.
93. Fernandez-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev*. 2003; 24:278-301.
94. Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005; 19(4):547-66.
95. Vachharajani V, Vital S. Obesity and Sepsis. *J Intensive Care Med*. 2006; 21: 287-95.
96. Scott LK, Vachharajani V, Minagar A, Mynatt RL, Conrad AS. Brain RNA expression in obese vs. lean mice after LPS-induced systemic inflammation, *Front Biosci*. 2004; 2686–96.
97. Scott L.K., Vachharajani V., Minagar A., Mynatt R.L., Conrad S.A., Differential RNA expression of hepatic tissue in lean and obese mice after LPS-induced systemic inflammation, *Front Biosci*. 2005; 10: 1828–34.
98. El-Solh A, Sikka P, Bozkanat E, Jaafar W, Davies J. Morbid obesity in the medical ICU. *Chest*. 2001; 120:1989–97.
99. Yaegashi M, Jean R, Zuriqat M, Noack S, Homel P. Outcome of morbid obesity in the intensive care unit, *J. Intensive Care Med*. 2005; 20: 147–54.
100. Singer G, Granger DN. Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. *Microc*. 2007; 14:375–387.
101. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 2006; 64: 355– 365.
102. Takashiba KS, Segatelli TM, Moraes SMF, Natali MRM. Morfologia testicular de ratos Wistar obesos sedentários e submetidos a treinamento físico. *H Sci*. 2011; 33: 25-33.

103. Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock*. 2005; 24:19-23.
104. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 2005; 24: S52-S57.
105. Rocha MJA, Oliveira GR, Farias-Corrêa PB. Neurohypophyseal hormone secretion during septic shock. In: Chen FJ (Ed.), 75-94, *New Trends in Brain Research*. New York: Nova Science Publishers, 2006.
106. Witchterman KA, Baue AE, Chaudry IH . Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*. 1980; 29:189–201.
107. Hollenberg SM, Dumasius A, Easington C, Colilla SA, Neumann A, Parrillo JE. Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164:891-95.
108. Brasil. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. Dispõe sobre o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA do CONCEA. *Diário Oficial da União*. 09 de out; secção 1:1.
109. Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Oller do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutri*. 2004; 20(2):218-24.
110. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 1968; 40:527-8.
111. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J surg res*. 1990; 49:186-96.
112. O'Connor CA, Cernak I, Vink R. Both estrogen and progesterone attenuate edema formation following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Res*. 2005; 1062:171-74.
113. Uyama O, Okamura N, Yanase M, Narita M, Kawabata K, et al. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1988; 8:282–84.
114. 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; 126:131–3.8.
115. 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. *Ag Act*. 1989; 26:335–41.
116. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Met Enzy*. 1990; 186:421–431.

117. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186:464–78.
118. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-6.
119. Bannister JV, Claberese L. Assays for superoxide dismutase. *Meth Bio Anal.* 1987; 32:231–79.
120. Lowry OH, Rosebrough AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265–75.
121. Vachharajani V. Influence of obesity on sepsis. *Pathophysiology.* 2008;15(2):123-34.
122. Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med.* 1995; 23:1638–52.
123. Sprung CL, Peduzzi PN, Shatney CH, Schein RM, Wilson MF, Sheagren JN, Hinshaw LB. Impact of encephalopathy on mortality in the sepsis syndrome. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group. *Crit Care Med.* 1990; 18:801-6.
124. Sumi N, Nishioku T, Takata F, Matsumoto J, Watanabe T, Shuto H, et al. Lipopolysaccharide-activated microglia induce dysfunction of the blood-brain barrier in rat microvascular endothelial cells co-cultured with microglia. *Cell Mol Neurobiol.* 2010;30(2):247-53.
125. Vachharajani V, Russell JM, Scott KL et al. Obesity exacerbates sepsis-induced inflammation and microvascular dysfunction in mouse brain. *Microc.* 2005; 12:183 - 94.
126. Vachharajani V, Vital S, Russell J, Granger DN. Hypertonic saline and the cerebral microcirculation in obese septic mice. *Microcirc.* 2007;14:223 - 31.
127. Kahles T, Luedike P, Endres M, Galla HJ, Steinmetz H, et al. NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stk.* 2007; 38: 3000–6.
128. 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.* 2006; 34: 1073–79.
129. Berg RM, Møller K, Bailey DM, Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011; 31: 1532-44.
130. Santiago AP, 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: 1566 -77.

131. Vieira A, Michels M, Florentino D, Lauriano AA, Danielski LG, Fortunato JJ, Barichello T, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Petronilho F. Increased on oxidative brain injury in the diabetic rats following sepsis. *Synapse*. 2014; 68(9):410-18.
132. Arvidsson S, Falt K, Marklund S, Haglund U. Role of free oxygen radicals in the development of gastrointestinal mucosal damage in *Escherichia coli* sepsis. *Circ Shock*. 1985; 16: 383-93.
133. Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Med*. 2008; 34: 1724–31.
134. 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: 2186–90.
135. 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. *Med Biol Res*. 2007; 40: 831–7.
136. Rege SD, Kumar S, Wilson DN, Tamura L, Geetha T, Mathews ST. et al. Resveratrol Protects the Brain of Obese Mice from Oxidative Damage. *Oxid Med and Cell Long*. 2013; 2013: 7p.
137. Charradi K, Elkahoui S, Karkouch I, Limam F, Hassine FB, Aouani E. Grape seed and skin extract prevents high-fat diet-induced brain lipotoxicity in rat, *Neuro Res*. 2012; 37: 2004–213.
138. Adibhatla RM, Hatcher JF. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell Biochem*. 2008; 49: 241–6.
139. Wenk MR. The emerging field of lipidomics. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4:594–610.
140. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. 2000; 62: 649–71.
141. Alzoubi KH, Khabour OF, Salah HA, Hasan Z. Vitamin E prevents high-fat high-carbohydrates diet-induced memory impairment: the role of oxidative stress. *Physiol Behav*. 2013; 2(119):72-8.
142. Michels M, Vieira AS, Vuolo F, Zapelini HG, Mendonça B, Mina F, et al. The role of microglia activation in the development of **sepsis**-induced long-term cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2014;14: 392-4.
143. Schwalm MT, Pasquali M, Miguel SP, Dos Santos JP, Vuolo F, Comim CM, et al. Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. *Mol Neurobiol*. 2014; 49(1):380-5.