UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
KIUANNE LINO LOBO METZKER

O IMPACTO DA ATIVIDADE DA TRIPTOFANO 2,3-DIOXIGENASE SOBRE A DISFUNÇÃO CEREBRAL EM CURTO E LONGO PRAZO EM MODELO ANIMAL DE SEPSE

Tubarão
2021

KIUANNE LINO LOBO METZKER

O IMPACTO DA ATIVIDADE DA TRIPTOFANO 2,3-DIOXIGENASE SOBRE A DISFUNÇÃO CEREBRAL EM CURTO E LONGO PRAZO EM MODELO ANIMAL DE SEPSE

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

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

Orientadora: Profª. Fabricia Cardoso Petronilho, Dra.

Tubarão

2021

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÙDE - DOUTORADO

Título da Tese

O impacto da atividade da triptofano 2,3-dioxigenase sobre a disfunção cerebral em curto e longo prazo em modelo animal de sepse

KIUANNE LINO LÔBO METZKER
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 10 de dezembro de 2021.

Doutora Fabricia Cardoso Petronilho (Orientador) _____

Doutora Amanda Della Giustina (Avaliador externo - Universidade de Ottawa/Canadá) - *presente por videoconferência*

Doutora Leandra Celso Constantino (Avaliador externo - IDOR) - *presente por videoconferência*

Doutora Gislaine Tezza Rezin (Avaliador interno - PPGCS) - *presente por videoconferência*

Doutor Rafael Mariano de Bitencourt (Avaliador interno - PPGCS) - *presente por videoconferência*

Professor Doutor Jefferson Luiz Traebert
COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

M55 Metzker, Kiuanne Lino Lobo, 1989 -
O impacto da atividade da triptofano 2,3-dioxigenase sobre a disfunção cerebral em curto e longo prazo em modelo animal de sepse / Kiuanne Lino Lobo Metzker. – 2021.
76 f. : il. color. ; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.
Orientação: Profa. Dra. Fabricia Cardoso Petronilho

1. Septicemia. 2. Estresse oxidativo. 3. Comprometimento cognitivo. I. Petronilho, Fabricia Cardoso. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.944

Ficha catalográfica elaborada por Carolini da Rocha CRB 14/1215

Dedico este trabalho a minha filha Giovanna

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.
A meu marido Naron pela compreensão e incentivo durante a minha jornada.
A minha filha Giovanna por sempre alegrar meus dias e ser minha maior motivação para não desistir.
A minha família que sempre me apoiou e acreditou em mim.
A minha professora e orientadora Fabrícia Cardoso Petronilho pela confiança no meu trabalho e dedicação nas orientações.
A todos os colegas do Neuroimet - Núcleo Sepse, pela parceria nos experimentos e dia a dia no laboratório.
A todos os professores e colaboradores do PPGCS pela troca de conhecimento, pelos conselhos e contribuições.
Aos alunos e professores de laboratórios e instituições parceiras, pelo apoio e auxílio na execução das análises laboratoriais.
Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) e a Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) a qual proveu os meios necessários para a conclusão do doutoramento.
Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC) por propiciar fomento para a realização desta pesquisa.
A todos vocês, meu muito obrigada!

Viva como se fosse morrer amanhã. Aprenda como se fosse viver para sempre.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Introdução: A quinurenina é catalisada por triptofano-2,3-dioxigenase (TDO) em resposta à inflamação e a ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA). Este caminho é regulado positivamente no cérebro séptico, no entanto a contribuição biológica da inibição de TDO sobre alterações cerebrais agudas e de longo prazo após sepse não foram investigadas anteriormente.

Objetivo: Investigar o envolvimento da TDO sobre as alterações cerebrais precoces e tardias após a sepse experimental.

Métodos: Ratos Wistar machos de dois meses de idade foram submetidos ao modelo de sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP) ou somente laparotomia (sham). Os animais receberam alopurinol (20 mg / kg) um inibidor de TDO ou veículo (1ml / kg), 12h após cirurgia e diariamente por 7 dias. O córtex pré-frontal e o hipocampo foram isolados 24 horas após o CLP para a análise de citocinas, mieloperoxidase (MPO), nitrito / nitrato (N/N), estresse oxidativo e atividade da cadeia transportadora de elétrons (CTE) da mitocôndria. Um subconjunto de animais foi seguido por 10 dias para avaliação de sobrevivência, testes comportamentais e análise de estresse oxidativo.

Resultados: Na análise das alterações agudas foi verificado que a administração do alopurinol inibiu a elevação de interleucina 6 (IL-6), preservou a atividade das enzimas antioxidantes e as atividades dos complexos I e II da CTE no hipocampo. O alopurinol também reduziu a MPO, N/N, dano oxidativo aos lipídios e o dano de proteína em ambas as estruturas cerebrais 24 horas após a indução da sepse. Quanto as alterações a longo prazo, foram prevenidos o comportamento depressivo e o comprometimento da memória de curta duração.

Conclusão: A inibição de TDO foi eficaz em prevenir as alterações comportamentais bem como o reduzir a neuroinflamação, estresse oxidativo e a alteração da atividade mitocondrial após a sepse.

Descritores: sepse, estresse oxidativo, comprometimento cognitivo.

ABSTRACT

Introduction: Kynurenine is catalyzed by tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) and in response to inflammation and activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. This pathway is up-regulated in the septic brain, however, a biological contribution of TDO inhibition on acute and long-term brain changes after sepsis has not been previously investigated.

Objective: To investigate the involvement of TDO on early and late brain changes after experimental sepsis.

Methods: Two-month-old male Wistar rats were modeled for sepsis by cecal ligation and perforation (CLP) or laparotomy only (sham). Animals received Allopurinol (20 mg/kg) a TDO inhibitor or vehicle (1ml/kg) 12h after surgery and daily for 7 days. The prefrontal cortex and hippocampus were submitted 24 hours after CLP for an analysis of cytokines, myeloperoxidase (MPO), nitrite/nitrate (N/N), oxidative stress and mitochondrial electron transport chain (CTE) activity. A subset of animals was followed for 10 days to assess behavioral tests and oxidative stress analysis.

Results: When analyzing the acute changes, it was concluded that the administration of allopurinol inhibited the elevation of interleukin 6 (IL-6), preserved the activity of antioxidant enzymes and the activities of complexes I and II of CTE in the hippocampus. Allopurinol also reduced MPO, N/N, lipid oxidative damage and protein damage in both brain structures 24 hours after sepsis induction. As for long-term changes, allopurinol prevented depressive behavior and short-term memory impairment.

Conclusion: Inhibition of TDO was effective in preventing behavioral changes as well as reducing neuroinflammation, oxidative stress and alteration of mitochondrial activity after sepsis.

Keywords: sepsis, oxidative stress, cognitive impairment.

LISTAS

Lista de abreviatura

AA - Ácido antranílico
ACMS - 2-amino-3-carboximuconato-6-semialdeído
ACMSD - 2-amino-3-carboximuconato-6-semialdeído descarboxilase
ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico (do ingles, *Adrenocorticotrophic hormone*)
ADP - Adenosina difosfato (do inglês, *adenosine diphosphate*)
AMS - Semialdeído 2-carboximuconato (do inglês, *2-Aminomuconid-6-semialdehyde*)
AMSD - Semialdeído 2-carboximuconato desidrogenase (do inglês, *2-Aminomuconid-6-semialdehyde dehidrogenase*)
AQ – Ácido quinolínico
ATP - Trifosfato de adenosina (do inglês, *Adenosine triphosphate*)
BHE – Barreira hematoencefálica
CAT – Catalase
Cl^{-2} - Íon de cloro
CLP – Ligação e perfuração cecal (do inglês, *Cecal ligation and puncture*)
CLRs - Receptores de lectina tipo C (do inglês, *Type C lectin receptors*)
CTE – Cadeia transportadora de elétrons
DAMPs - Padrões moleculares associados ao dano (do inglês, *Damage-associated molecular patterns*)
DCIP - 2,6-dicloroindofenol (do inglês, *2,6-dichloroindophenol*)
DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)
EAS – Encefalopatia associada a sepse
EC-SOD – Superóxido dismutase extracelular (do inglês, *Extracellular superoxide dismutase*)
ELISA – Ensaio imuno-enzimático (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*)
ERNs – Espécies reativas de nitrogênio
EROs – Espécies reativas de oxigênio
EUA - Estados Unidos da América
FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, *Food and Drug Administration*)

GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina (do inglês, *Guanosine monophosphate Cyclic*)

GPx - Glutationa peroxidase

GR - Glutationa reduzida

H^+ - Cátion hidrogênio

HO^- - Radical hidroxila

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

HOCl - Ácido hipocloroso

HPA - Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

IDO - Indoleamina 2,3 dioxigenase

IFN tipo I - Interferon tipo 1

IL-6 – Interleucina 6

IL-1 – Interleucina 1

IL-10 – Interleucina 10

KAT - Quinurenina aminotransferase (do inglês, *Kynurenine aminotransferase*)

KMO – Quinurenina Monooxigenase (do inglês, *Kynurenine monooxygenase*)

KYNA - Ácido quinurênico (do inglês, *Kynurenic acid*)

LTM - Memória de longa duração (do inglês, *Long-term memory*)

LOOH - Hidroperóxido lipídico (do inglês, *Lipid hydroperoxide*)

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK - Proteína quinase ativada por mitogênio (do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinases*)

MIA - Morte indolor assistida

MPO – Mioloperoxidase

NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NF-κB- Fator nuclear-κB (do ingles, *Nuclear Factor kappa B*)

NLRs – Receptores do tipo NOD (do inglês, *NOD-like – receptors*)

NMDA - N-metil D-Aspartato

N/N – Nitrito+nitrato

O^{2-} - Ânion superóxido

OMS - Organização Mundial de Saúde

$ONOO^-$ - Peroxinitrito

ON - Óxido nítrico

ONs - Óxido nítrico sintase

PAMPs – Padrão molecular de reconhecimento de patógeno (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*)

PMS - Metossulfato de fenazina (do inglês, *Phenazine Methosulfate*)

QPRT - Quinolinato de fosforibosil transferase (do inglês, *Quinolinate phosphoribosyl transferase*)

RAGE - Receptor para produtos finais de glicação avançada (do inglês, *receptor for advanced glycation end products*)

RIG-I - Gene indutível pelo ácido retinóico I (do inglês, *Retinoic acid-inducible gene I*)

RNA - Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)

RRP - Receptores de reconhecimento de padrão

SDH – Succinato desidrogenase (do inglês, *Succinate dehydrogenase*)

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

SOD-1 – Superóxido dismutase 1

SOD-2 – Superóxido dismutase 2

SOD-3 – Superóxido dismutase 3

SOFA – Sistema de pontuação de disfunção orgânica (do inglês, *Sequential Organ Failure Assessment*)

STM – Memoria de curta duração (do inglês, *Short-term memory*)

SUS - Sistema Único de Saúde

TAN-1 - Transportador de aminoácidos neutros 1

TAO - Transportadores de ânions orgânicos

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances*)

TCA - Ácido tricarboxílico (do inglês, *Tricarboxylic acid*)

TDO- Triptofano-2,3-dioxigenase

TLR - Receptor Toll-like (do inglês, *Toll-like receptors*)

TLR-4 - Receptor Toll-like 4 (do inglês, *Toll-like receptors 4*)

TNF-α – Fator de necrose tumoral α (do inglês, *Tumor necrosis fator α*)

UTIs – Unidades de terapia intensiva

3HAA - Acido 3-hidroxiantranílico (do inglês, *3-Hydroxyanthranilic Acid*)

3HAO - 3-hidroxiantranílico-3,4- dioxigenase

3-HK - 3-hidroxiquinurenina (do inglês, *3-Hydroxykynurenine)*

Lista de quadros

Quadro 1 – Sistema de pontuação SOFA 17
Quadro 2 - Manifestações clínicas por sistemas de orgãos.....18
Quadro 3 - EROs e sua relevância biológica.....24
Quadro 4 - ERNs e sua relevância biológica.....25

Lista de figuras

Figura 1 – Fontes de produção de ATP 22
Figura 2 - Reação de dismutação do O_2^- pela enzima SOD.....266
Figura 3 - Reação de decomposição do H_2O_2 pela enzima CAT 27
Figura 4 - Reação de decomposição do H_2O_2 pela enzima GPx 27
Figura 5 - Representação da via da quinurenina.....31
Figura 6 - Via da quinurenina no SNC.....34
Figura 7 - Estrutura química do alopurinol.....37
Figura 8 - Representação do experimento 1.....41
Figura 9 - Representação do experimento 2.....42
Figura 10 - Modelo animal de sepse por CLP.....43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO 16
1.1.1 Sepse: definição e aspectos epidemiológicos 16
1.1.2 Fisiopatologia da sepse 20
1.1.3 Cadeia respiratória mitocondrial 22
1.1.4 Estresse oxidativo 23
1.1.4.1 Radicais livres, EROs e ERNS 23
1.1.4.2 Antioxidantes 26
1.1.5 Disfunção cerebral associada a sepse 27
1.1.6 Via das quinureninas 30
1.1.6.1 Triptofano dioxigenase (TDO) 35
1.1.6.2 Alopurinol 36
2. OBJETIVOS 39
2.1 OBJETIVO GERAL 39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 39
3. MÉTODOS 40
3.1 TIPO DE ESTUDO 40
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS 40
3.3 ANIMAIS 40
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO 41
3.5 TÉCNICAS 42
3.5.1 Modelo experimental de sepse 42
3.5.2 Tratamentos 44
3.5.3 Morte indolor assistida e coleta de amostras biológicas 44
3.5.4 Determinação dos marcadores inflamatórios 44
3.5.5 Avaliação da Mieloperoxidade (MPO) 44
3.5.6 Determinação do Nitrito e Nitrato (N/N) 45
3.5.7 Avaliação do estresse oxidativo 45
3.5.7.1 Avaliação de dano aos lipídios 45
3.5.7.2 Avaliação de dano a proteínas 45
3.5.7.3 Avaliação da atividade da SOD 46

3.5.7.4 Avaliação da atividade da CAT..... 46
3.5.8 Avaliação da atividade da SDH.....46
3.5.9 Avaliação dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.....47
3.5.10 Análise da concentração de proteínas totais.....48
3.5.11 Análise de sobrevida.....48
3.5.12 Testes comportamentais para avaliação de dano cognitivo.....48
3.5.12.1 Avaliação do reconhecimento de objetos.....48
3.5.12.2 Teste do Nado Forçado.. 49
3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....50
3.7 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....50
4. ARTIGO.....51
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 54
REFERÊNCIAS.....55
ANEXO A - Parecer de aprovação do comitê de Ética.....68
ANEXO B - Produção científica.....69

1. INTRODUÇÃO

A sepse é uma condição caracterizada por um conjunto de alterações clínicas decorrentes de um processo infeccioso que se não contido, sua evolução culmina na síndrome da disfunção de múltiplos órgãos[1].

Em 2017 foi relatado uma estimativa de 48,9 milhões casos com 11,0 milhões mortes relacionadas à sepse, representando 19,7% de todas as mortes globais[2]. Por isso, essa doença é considerada um importante problema de saúde pública mundial[3]. Nos Estados Unidos da América (EUA) por exemplo, a sepse grave é a terceira causa de morte mais comum, depois de doenças do coração e neoplasias malignas[4].

No Brasil, um estudo no banco de dados de avaliação de prevalência de sepse, relatou uma incidência de sepse em unidades de terapia intensiva (UTIs) de 36,3/1000 pacientes-dia com mortalidade de 55,7%. Neste estudo, a elevada mortalidade esteve associada à baixa disponibilidade de recursos e adequação ao tratamento[5].

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a sepse como uma prioridade global de saúde por ser responsável por inúmeras mortes prematuras[6]. Já nos sobreviventes, ocorre o enfrentamento de incapacidades a longo prazo como sequelas neurológicas, gerando limitações físicas, psicológicas e comprometimento cognitivo[6–9]. Entre os sobreviventes de sepse foi observado comprometimento cognitivo entre 12,5% a 21%[10].

Nesse contexto, a sepse pode gerar a encefalopatia associada à sepse (EAS) que é uma disfunção cerebral transitória e reversível, a qual ocorre mesmo quando a fonte de sepse está localizada fora do sistema nervoso central (SNC)[11]. Em se tratando de aspectos fisiopatológicos, a EAS está intimamente relacionada à inflamação sistêmica, onde há produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias e agentes oxidantes, gerando alterações na barreira hematoencefálica (BHE), bem como alterações de neurotransmissores, além da disfunção mitocondrial[9,12]. Nesse espectro de alterações, a produção aumentada de agentes oxidantes juntamente com o desequilíbrio do sistema antioxidante pode gerar um processo chamado de estresse oxidativo comprometendo a homeostasia celular e levando a lesão neurológica além da resposta neuroinflamatória exacerbada e progressiva[13,14].

Uma das vias que pode estar relacionada com a progressão do estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunção cognitiva, é a via da quinurenina[15,16]. O triptofano é o ponto de partida para a biossíntese da serotonina[17]. Já em processos

inflamatórios no SNC, apenas 5% do triptofano é direcionado para a formação da serotonina, os outros 95%, são convertidos em quinurenina[18].

Sabe-se ainda que a quinurenina se encontra elevada na sepse severa e choque séptico e está associada com uma elevada taxa de mortalidade[19]. No que se refere ao SNC, recentemente foi demostrado níveis cerebrais aumentados de quinurenina em modelo experimental de sepse[20].

A conversão do triptofano em quinurenina se dá por ação das enzimas indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) e da triptofano 2,3-dioxigenase (TDO)[18]. A TDO está envolvida na progressão de doenças neurodegenerativas, por isso a inibição desta enzima representa uma estratégia neuroprotetora viável[21,22].

Com isso, sabendo que a via da quinurenina está ativada no cérebro durante a sepse e possui relação com alterações neurológicas e comportamentais então é de extrema importância compreender melhor esse mecanismo[17]. Dessa forma, partindo do conhecimento que a via da quinurenina está envolvida no dano cognitivo e neuroinflamação, temos como hipótese que ao inibir a TDO que é uma das enzimas que ativa a via da quinurenina, será encontrado o seu envolvimento com o dano agudo e a longo prazo em modelo de sepse.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Sepse: definição e aspectos epidemiológicos

O conhecimento da sepse foi historicamente baseado na evidência de bacteremia persistente, pois mais da metade dos casos de sepse são causados por bactérias gram-negativas podendo evoluir para choque séptico[23]. A apresentação clínica da sepse depende do local da infecção e nos sinais e sintomas que fazem parte da resposta do hospedeiro[24].

No consenso atual publicado no início de 2016, a sepse foi definida como a disfunção de órgãos com potencial risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente à infecção e ainda temos o choque séptico como um subconjunto de sepse com hipotensão persistente na qual anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas aumentam substancialmente a mortalidade[3]. Com a nova definição, extinguiu-se a nomenclatura sepse grave, que identificava a sepse associada à disfunção orgânica, mantendo-se apenas os termos sepse e

choque séptico[3]. A disfunção orgânica pode ser identificada como uma alteração aguda no sistema de pontuação de disfunção orgânica (SOFA, do inglês *Sequential Organ Failure Assessment*) com um total de pontuação ≥ 2 pontos consequentes à infecção. A tabela de SOFA pode ser observado na Quadro 1[25].

Quadro 1 - Sistema de pontuação SOFA

Sistema de pontuação					
Pontuação	0	1	2	3	4
Respiração					
PaO_2/FiO_2	≥400	<400	<300	<200 com suporte respiratorio	<100 suporte respiratorio
Coagulação					
Plaquetas $10^3/mm^3$	>150	<150	<100	<50	<20
Fígado					
Bilirrubina mg/dL	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>12,0
Cardiovascular					
Pressão arterial	PAM>70	PAM<70	Dopamina <5 ou Dobutamina qualquer dose	Dopamina >5 ou Epinefrina <0,1 ou Norepinefrina <0,1	Dopamina >15 ou Epinefrina >0,1 ou Norepinefrina >0,1
SNC					
Escala de coma de Glasgow	>14	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinina	<1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9	>5,0

Fonte: Adaptado de Vincent., et al[25]

Os primeiros sinais de sepse são mais inespecíficos como febre (embora também possa haver hipotermia), taquicardia , taquipneia ou estado mental alterado[26]. Ainda dependendo da gravidade da infecção, o indivíduo pode apresentar também hipotensão e alteração na troca gasosa, mesmo quando o foco da infecção está fora do tórax[24]. O tratamento da sepse deve ser realizado como uma emergência médica por isso a identificação de sinais e sintomas como pode ser observado no Quadro 2 facilita a identificação para que seja feita uma intervenção mais precoce[27].

Quadro 2 - Manifestações clínicas por sistema de órgãos

Manifestações clínicas por sistema de órgãos	
Cardiovascular	Alto débito cardíaco Vasodilatação Elevação da troponina Hipotensão Depressão Miocárdica (estado tardio) Cardiopatia séptica (estado tardio)
Pulmonar	Edema pulmonar não cardiogênico Hipoxia Taquipneia Síndrome da angústia respiratória aguda
Renal	Lesão renal aguda Necrose tubular aguda Hipercalemia Acidose metabólica
Hematológico	Anemia Leucocitose Neutropenia Trombocitopenia Coagulação intravascular disseminada
Gastrointestinal	Hepatite isquêmica Colestase induzida por sepse Coagulopatia Hiperamonemia
Endócrino	Hiperglicemia Insuficiência adrenal Deficiência de vasopressina Hipoglicemia (estado tardio)
Neurológico	Alteração do estado mental Alucinação Agitação

Fonte: Adaptado de Font, Thyagarajan, Khanna[26]

As altas taxas de incidência e de mortalidade de sepse levaram a OMS a incluir a sepse nas prioridades de saúde mundial[28]. Nos EUA, a incidência de sepse é de 3 casos a cada 1000 habitantes, onde ¼ dos pacientes que são hospitalizados acabam falecendo, sendo a maior causa de morte em UTIs não cardíacas[27,29,30]. Nos pacientes que evoluem para choque séptico, a mortalidade é de aproximadamente 50%[31]. Ainda tem se observado que o aumento na incidência de sepse nos últimos anos possui relação com o envelhecimento da população, doenças crônicas associadas, uso de imunossupressores, transplantes, quimioterapias e procedimentos invasivos[31].

No Brasil há um aumento progressivo no número de casos de sepse nas UTIs, de 19,4% do total de internações em 2010, para 25,2% em 2016[32].No entanto as taxas de mortalidade caíram de 39% em 2010, para 30% em 2016[32]. Ainda, de acordo com o relatório nacional elaborado pelo Instituto Latino-Americano de Sepse e publicado em julho de 2015 envolvendo indivíduos sépticos admitidos em 116 centros de atendimentos desde o ano de 2005, exatamente 27.854 pessoas foram diagnosticadas com a doença, com predominância do gênero masculino (51,9%) e indivíduos entre a fase adulta e idosos (61,4 ± 21,5 anos), ainda dentre o total avaliado 62,8% dos indivíduos apresentaram sepse grave e 37,2% choque séptico[33].

Ainda só no ano de 2015 a taxa de mortalidade foi de 28,6% em hospitais privados e 52,4% em hospitais públicos[33]. Além da elevada mortalidade, os custos diretos estimados em pacientes com sepse são cerca de seis vezes maiores quando comparados a pacientes sem sepse, constituindo um preocupante problema para os serviços de saúde, em particular nos países em desenvolvimento[29]. De acordo com um estudo realizado em UTIs no Brasil, a baixa disponibilidade de recursos é um dos principais fatores associados à maior mortalidade hospitalar[5]. Sendo a taxa de mortalidade padronizada de hospitais privados por exemplo de 0,98 bem menor que a de hospitais públicos que é de 1,34 e onde geralmente há falta de recursos e má distribuição de vagas[32].

E mesmo após a hospitalização, os sobreviventes da sepse podem apresentar um elevado gasto para saúde pública, pois grande parte dos sobreviventes apresentam algumas sequelas neurológicas[25] e comprometimento da qualidade de vida em até 5 anos após a infecção[34].

Em um estudo nacional feito por Calsavara et al. com sobreviventes de sepse, foi verificado que as frequências de ansiedade e depressão 24 horas após a alta da UTI foram 67% e 49%, respectivamente. Entre os pacientes reavaliados 1 ano após a alta da UTI, as frequências foram 38% para ansiedade e 50% para depressão, mostrando com isso, que pacientes que sobrevivem à sepse apresentam altos níveis de sintomas psiquiátricos[35].

Ainda nos sobreviventes da sepse, há um aumento de três vezes no risco de declínio cognitivo em comparação à população controle[36]. Portanto, mesmo com os avanços da terapia e detecção precoce da sepse, com o aumento da sobrevida, existe uma grande preocupação com as sequelas causadas pela doença[37].

1.1.2 Fisiopatologia da sepse

A sepse é resultado da ação de microrganismos como fungos, parasitas, vírus e principalmente bactérias[23]. Em resposta a invasão desses microrganismos, o corpo desencadeia a produção de mediadores inflamatórios que gera um conjunto de sinais e sintomas como febre ou hipotermia, taquicardia e taquipneia[38].

Se os microrganismos superarem a defesa imunológica de um hospedeiro, eles podem se estender localmente ou se espalhar para tecidos e órgãos através da corrente sanguínea[30]. Em geral, a infecção tem início em um sítio primário e se espalha para outras regiões[39]. Os sítios primários de maior incidência são as infecções no trato urinário, presente em 27,8% dos casos, seguido do trato respiratório (27,5%) e seguida de infecções intra-abdominal (10,8%)[39].

A fisiopatologia da sepse envolve a ativação e desregulação de respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias do sistema imune inato, complemento e sistemas de coagulação, alterações metabólicas, alterações hormonais, disfunção mitocondrial, disfunção epitelial e microcirculatória[40]. A resposta aguda inicial normalmente é feita por macrófagos que produzem uma variedade de citocinas pró-inflamatórias podendo desencadear uma tempestade de citocinas e ativar o sistema imunológico inato[41].

A ativação do sistema imune inato se inicia quando os receptores de reconhecimento de padrões (RRPs) presentes nas células reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs)[42]. São caracterizados como PAMPs, o lipopolissacarídeo (LPS) e o ácido lipoteicóico que são componentes da parede bacteriana das bactérias gram-negativas e gram-positivas, respectivamente. Esses componentes são os principais ativadores da resposta inflamatória do hospedeiro[43].

No caso de uma inflamação estéril causada por dano tecidual, trauma e isquemia, os RRPs reconhecem moléculas específicas do hospedeiro denominadas padrões moleculares associados ao dano (DAMPs)[44]. Esses fatores endógenos (DAMPs) e exógenos (PAMPs) podem interagir com vários RRPs como os receptores de lectina tipo C (CLRs), receptores semelhantes ao gene indutível por ácido retinóico I (RIG-I), receptores do tipo NOD (NLRs) e receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), mas o RRP mais relacionados com a resposta imune na sepse são os receptores da família Toll like (TLR)[43].

O receptor do tipo Toll like 4 (TLR-4) é o responsável pelo reconhecimento de LPS e sua ativação leva a uma cascata de sinalização que promove a transcrição de

genes responsáveis pela resposta inflamatória[45]. Em seguida ocorre a ativação da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), fator nuclear-κB (NF-κB) e fator regulador de interferon que leva à secreção de citocinas inflamatórias, interferon tipo 1 (IFN tipo I), quimiocinas e peptídeos antimicrobianos[46].

As quimiocinas são secretadas durante a resposta inflamatória pelas células hospedeiras e ativam a migração de leucócitos para o local da infecção ou inflamação[47]. Os leucócitos produzem citocinas pró-inflamatórias que incluem fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina 6 (IL-6) e membros da família interleucina 1 (IL-1)[48]. A IL-6, é produzida principalmente pelos macrófagos e linfócitos, mas também é expressa por várias células em resposta à infecção[49]. Quando ocorre inflamação, os neutrófilos são ativados e interagem com as células endoteliais que migram para o local da inflamação, impulsionados pelas quimiocinas, onde reconhecem e fagocitam os patógenos[50].

O efeito microbicida dos neutrófilos e macrófagos se dá principalmente através de diferentes vias oxidativas[51]. A propagação da formação de moléculas com potencial oxidante associada à ativação da oxido nítrico sintase (ONs) com produção excessiva de oxido nítrico (ON) pela inflamação resulta no aumento do estresse oxidativo[51].

Essa geração excessiva de ON pode inibir diretamente a respiração mitocondrial através da inibição da cadeia transportadora elétrons (CTE) onde é um local importante de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)[52]. A disfunção da CTE ainda pode causar danos diretos à estrutura mitocondrial e a outras estruturas, como a membrana lipídica e até mesmo danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial[53]. Essa disfunção nas mitocôndrias pode alterar a produção de trifosfato de adenosina (ATP) e a produção de energia para a função celular e a homeostase metabólica[54,55].

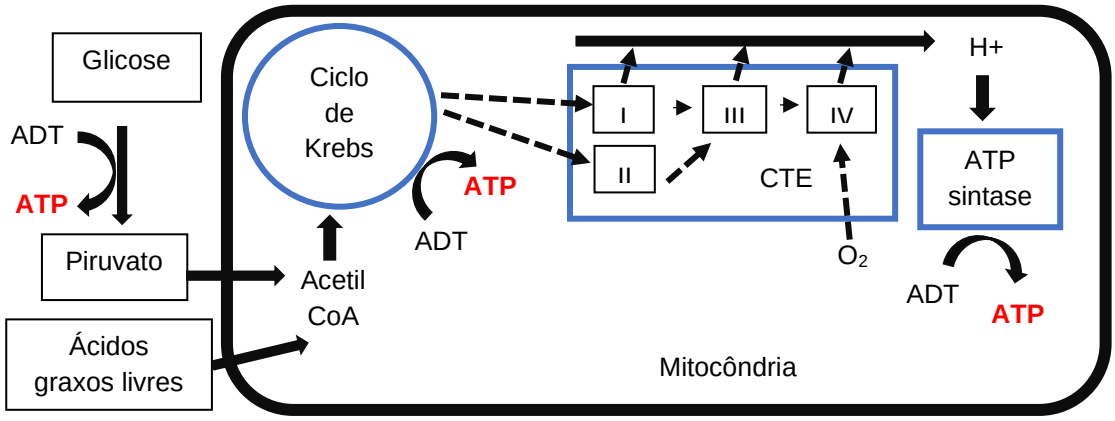
Na sepse, sabe-se que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial estão na gênese da disfunção de múltiplos órgãos incluindo a disfunção cerebral por promover dano em biomoléculas e com isso gerar ou agravar o dano neuronal e levar ao comprometimento cognitivo[56].

1.1.3 Cadeia respiratória mitocondrial

As mitocôndrias são uma fonte importante de EROs e ainda são o principal alvo de danos causados por suas próprias EROs[57]. A membrana mitocondrial interna contém a CTE que é formada por complexos de proteínas responsáveis pela geração de ATP[58].

O processo de formação de ATP, como pode ser observado na Figura 1 ocorre inicialmente através da metabolização da glicose na via glicolítica a convertendo em piruvato[53]. O piruvato e os ácidos graxos livres entram na mitocôndria, onde são convertidos em Acetil CoA e entram no ciclo de Krebs onde é doado elétrons para os complexos I e II da CTE[53]. Esta cadeia tem cinco complexos enzimáticos (Complexos I-IV) e dois transportadores (ubiquinona e citocromo c), e os elétrons são movidos na cadeia para o Complexo IV onde o oxigênio é o aceptor terminal de elétrons[53]. Os prótons são bombeados através da membrana mitocondrial interna, criando um potencial elétrico e este potencial elétrico fornece a energia para a ATP sintase também chamado de Complexo V para fosforilar adenosina difosfato (ADP) em ATP[53]. Nessa via ainda uma quantidade relativamente pequena de ATP também é produzida pela glicólise e pelo ciclo de Krebs[53].

Figura 1. Fontes de produção de ATP.



Fonte: Adaptado de Singer, M[53].

A redução incompleta do oxigênio na CTE aumenta a produção de ânion superóxido (O^{2-}) que posteriormente é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), considerados EROs[59]. A formação de EROs pela CTE ocorre principalmente pelo complexo III, mas também pelo complexo I e sua produção é controlada por enzimas antioxidantes[60].

Na sepse, o processo inflamatório está associado a uma superprodução de ON e consequentemente, de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)[48]. O ON pode se ligar ao O^{2-} para formar ERNs e isso leva a uma inibição irreversível da atividade da CTE[48]. Com a disfunção da CTE, a matriz mitocondrial sobre edema e rompe-se e com isso o processo de apoptose é iniciado[61].

Ainda no processo de formação de ATP, a mitocôndria conta com a succinato desidrogenase (SDH), que é uma enzima do ciclo de Krebs e um componente integral do complexo II, localizada na membrana mitocondrial interna, sendo um membro da cadeia respiratória mitocondrial e liga o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) a cadeia respiratória[62]. Existem evidências de que o SDH é a principal fonte de geração de EROs nas mitocôndrias[63]. Estudos mostram mutação em subunidades SDH e a inibição de sua atividade desencadeia a neurodegeneração no cérebro[63].

1.1.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a defesa antioxidante e a geração de oxidantes[64]. Nesse desequilíbrio, há uma maior concentração de oxidantes que constitui um mecanismo de lesão para muitas doenças como doenças degenerativas, neurológicas, auto-imunes e ainda se sabe que está envolvida na patogênese da sepse[64]. No entanto, os oxidantes também tem funções importantes para o organismo, alguns são essenciais para a transdução de sinal mediada por fator de crescimento, função mitocondrial e manutenção do balanço redox[65].

1.1.4.1 Radicais livres, EROs e ERNs

O estresse oxidativo é causado principalmente por radicais livres que são moléculas pequenas, difusíveis que possuem elétrons desemparelhados[66]. Os radicais livres são instáveis e tendem a ser reativos e podem participar de reações em cadeia nas quais um único evento de iniciação pode ser propagado para danificar múltiplas moléculas[66]. Por aceitar em doar elétron, comportam-se como oxidantes ou redutores[67].

Entre as substâncias oxidantes que atuam no estresse oxidativo podemos citar o O^{2-}, H_2O_2, radical hidroxila (HO^-) e ácido hipocloroso (HOCl) como pode ser observado no Quadro 3[68].

Quadro 3 - EROs e sua relevância biológica.

EROs	Biologia / Função
Superóxido O^{2-}	Produzido principalmente pela reação do O_2 com um elétron da CTE da mitocôndria.
Peroxido de hidrogênio H_2O_2	Resultado de uma desintoxicação intermediaria de O_2 pela superóxido dismutase (SOD). Está envolvido na remodelação da estrutura das células e ativação de fatores de transcrição.
Radical Hidroxila OH^-	Produzido espontaneamente por HOCl com O_2^- ou íons metálicos, também produzido a partir de reação a H_2O_2. Devido a sua reatividade, meia-vida curta e modificação irreversível de macromoléculas, HO^- possui alta toxidade biológica.
Ácido hipocloroso HOCl	Formado por reações de mieloperoxidade (MPO) de cátion de hidrogênio (H^+), ion de cloro (Cl^{-2}), H_2O_2

Fonte: Adaptado de Zhi-We Ye *et al*[68]

A formação aumentada de EROs causa danos a lipídios, proteínas e DNA[69,70]. A peroxidação lipídica ocorre em ácidos graxos polinsaturados localizados nas membranas celulares[67]. Ela se inicia quando um EROs remove um átomo de hidrogênio produzindo deste modo o radical lipídico conjugado de dieno. Em seguida, a adição de oxigênio ao dieno, forma um radical que é altamente reativo o peroxil que por sua vez, ataca outro ácido graxo formando hidroperóxido lipídico (LOOH) um novo radical que tem como consequência a propagação da peroxidação lipídica[67,71].

O radical peroxil é geralmente considerado uma espécie de radical livre para a oxidação de proteínas e a oxidação de proteínas afeta a transdução de sinal, a atividade enzimática, a estabilidade térmica e susceptibilidade à proteólise o que leva ao envelhecimento[72]. Ainda os danos oxidativos a produtos proteicos podem afetar receptores, transporte de membrana e produzir grupos muito reativos que podem contribuir para danificar a membrana e muitas funções celulares[67,72].

O DNA e o ácido ribonucleico (RNA) são também suscetíveis a danos oxidativos, inclusive tem sido relatado que este dano em ácidos nucleicos tem papel importante em muitas doenças, incluindo o câncer e tem sido sugerido que a 8-hidroxi-

2-desoxiguanosina, um nucleotídeo oxidativo, pode ser usada como marcador biológico para o estresse oxidativo[73].

Além das EROs, podemos destacar as ERNs que incluem o ON e o radical peroxinitrito ($ONOO^-$) como pode ser observado no Quadro 4[74].

Quadro 4 - ERNs e sua relevância biológica

ERNs	Biologia / Função
O óxido nítrico ON	Sintetizado enzimaticamente por ONs, pode funcionar como um removedor de radicais livres, pois tem uma meia-vida longa em comparação com o O_2^- e HO^-. Em concentrações fisiológicas normais o ON é um mensageiro intracelular da guanilato ciclase e das proteínas quinases.
Peroxinitrito ONOO-	Em células com altas concentrações de ON como os leucócitos estimulados, a reação pode ser mais rápida do que a dismutação do O_2^- pela SOD, e então a ONOO- pode sofrer hemólise para formar HO^-

Fonte: Adaptado de Zhi-We Ye *et al*[68]

O ON é gerado após a conversão de L-arginina a L-citrulina, estimula a guanilato ciclase solúvel a produzir monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que por sua vez, afeta os níveis de cálcio intracelular para modular muitas atividades celulares como modulação da pressão arterial, controle do sistema imune, memória e aprendizado[75]. Na inflamação, o ON pode ser gerado por macrófagos produzindo ERNs como o ONOO- o que leva ao dano tecidual e contribui na inflamação, doenças neurodegenerativas e outras patologias[75].

De modo geral, as espécies reativas podem ser neutralizadas por espécies antioxidantes de baixo peso molecular (por exemplo, vitamina E e C , carotenóides , flavonóides , etc.) e enzimas antioxidantes de alto peso molecular, que são capazes de prevenir ou reparar os danos causados pelos radicais livres[76,77]. No que trata de enzimas antioxidantes, pode-se destacar a SOD, catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx)[76,77].

1.1.4.2 Antioxidantes

A primeira linha de defesa frente as espécies reativas são as enzimas SOD[78]. Esta enzima tem três principais isoformas sendo a superóxido dismutase 1 (SOD-1) formada por cobre e zinco (CuZn-SOD) presente em compartimentos citoplasmáticos intracelulares como citoplasma, núcleo e membrana plasmática já a superóxido dismutase 2 (SOD-2) é composta pelo metal manganês (Mn-SOD), que pode ser encontrada na mitocôndria e a superóxido dismutase extracelular (EC-SOD) também chamada de superóxido dismutase 3 (SOD-3), visualizada em elementos extracelulares sendo a única que atua no compartimento extracelular[68,79].

Independentemente da isoforma, a função da SOD é promover cataliticamente a dismutação do O_2^- a H_2O_2 (Figura 2), permitindo que as demais enzimas antioxidantes possam fazer posterior transformação à água[78].

Figura 2 – Reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela enzima SOD.

$$2\,O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2$$

Fonte: Adaptado de Schneider e de Oliveira[78]

Em conjunto com a SOD, atua a CAT que realiza a catalização e decomposição do H_2O_2. Possui um grupo prostético heme em seu sítio ativo com ferro metálico[80]. No ciclo de atividade antioxidante, a CAT catalisa a decomposição do H_2O_2 a O_2 e água (Figura 3)[78]. Esta enzima pode ser encontrada em mamíferos em maiores concentrações nos eritrócitos[80].

Figura 3 – Reação de decomposição do H_2O_2 pela enzima CAT.

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{CAT} O_2 + 2H_2O$$

Fonte: Adaptado de Schneider e de Oliveira[78].

Por fim, a GPx é uma enzima antioxidante intracelular que é selênio-dependente e possui atividade de peroxidase, ou seja, catalisa a redução do H_2O_2 a oxigênio e água, como a CAT, na presença de glutationa reduzida (GR) (Figura 4)[65].

Figura 4 – Reação de decomposição do H_2O_2 pela enzima GPx

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$$

Fonte: Adaptado de Schneider e de Oliveira[78].

O envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de comprometimento neuronal é demonstrado para a maioria das doenças neurodegenerativas[81]. Na maioria das doenças, o que leva ao dano oxidativo das moléculas é uma superprodução de EROs ou ainda a perda da função das vias antioxidantes que pode levar ao início da morte celular por isso, mesmo um pequeno aumento na produção de EROs em relação às taxas basais, requer elevada atividade antioxidante[82].

Na sepse além do dano direto causado pelo estresse oxidativo, ainda pode ocorrer hipóxia celular ou tecidual, apoptose, desregulação do sistema imunológico e disfunção mitocondrial, eventos esses associados a síndrome de disfunção múltipla de órgãos[83]. Todas estas alterações em tecidos periféricos como o fígado, rim, pulmão e coração podem ser potencializadas e serem responsáveis pelo menos em parte, pela disfunção neurológica na sepse[84].

1.1.5 Disfunção cerebral associada à sepse

Na população em geral encontra-se um aumento crescente de sobreviventes de sepse já que a sobrevivência em curto prazo da sepse melhorou nos últimos anos, no entanto, esses pacientes têm apresentado frequentemente incapacidades de longo prazo[85]. Pelo menos 20% dos sobreviventes de sepse tem alguma forma de sequela, como deficiência física ou cognitiva, distúrbios do humor e má qualidade de vida[36]. As taxas de ansiedade, depressão e transtorno de estresse pós-traumático são maiores nos sobreviventes de sepse do que no resto da população e esses transtornos após a sepse, representam um fardo significativo para a saúde pública, com cerca de 500.000 sobreviventes de sepse com deficiências funcionais nos EUA e 100.000 com comprometimento cognitivo moderado-grave[86].

Fisiopatologicamente, a disfunção cerebral na sepse está associada a sinais da resposta inflamatória da periferia que chegam até o parênquima cerebral. Os mediadores inflamatórios gerados já nas primeiras horas após a infecção na sepse podem prejudicar o funcionamento do SNC por meio de três vias conforme revisado por Sonneville et al.[87] :

1) Os sinalizadores inflamatórios gerados em nível periférico são reconhecidos por receptores no nervo vago e ativam sinais aferentes, que são retransmitidos ao tronco cerebral[87];

2) Estes sinalizadores inflamatórios também podem infiltrar-se no encéfalo através do plexo coroide e dos órgãos circunventriculares, que são regiões encefálicas desprovidas de BHE, reguladoras do sistema nervoso autônomo e neuroendócrino e que expressam componentes do sistema imune[87];

3) A produção de ON e citocinas inflamatórias na fase inicial da sepse ativam as células endoteliais periféricas e cerebrais e estimulam a liberação de mediadores inflamatórios no SNC, que influencia a permeabilidade da BHE[87].

Esses percursos instigam a ocorrência de resposta inflamatória local, a qual envolve a ativação de células microgliais, que são células residentes do SNC e, normalmente, permanecem em um estado de vigilância imune[88]. Entretanto, em situações de lesão cerebral ou estímulo imunológico, as micróglias mudam para o estado ativado[88].

Desta maneira, são capazes de sintetizar diversos compostos pró-inflamatórios e potencialmente neurotóxicos, como ON, espécies reativas como O^{2-} e citocinas inflamatórias como TNF-α e IL-1β[89]. Esta resposta é fundamental para a recuperação do SNC; todavia, adquire um caráter nocivo ao prolongar-se, pois gera danos secundários aos neurônios e exacerba a ocorrência de lesões estruturais, morte celular e disfunção neurológica[88]. Além disso, é responsável, por si só, em retroalimentar as lesões na BHE, causando assim um círculo vicioso de aumento da disfunção cerebral e lesão[90]. Tal disfunção afeta estruturas e funções cerebrais responsáveis pela memória e aprendizado, atenção e consciência, sendo a neuroinflamação, isquemia e neurotoxicidade os principais processos implicados na EAS[91].

O comprometimento da memória é indicativo de uma disfunção em estruturas importantes do SNC como o do hipocampo e córtex frontal[91]. O hipocampo é uma das

partes mais vulneráveis do cérebro e é altamente suscetível a isquemia e inflamação [92,93]. Se sabe ainda que a administração de LPS provoca a expressão de citocinas pro-inflamatórias no hipocampo e subsequentemente inibe a potenciação a longo prazo com morte neuronal tardia, ativação microglial e aumento do estresse oxidativo[91,94].

O córtex frontal, composto pelo córtex pré-frontal e por outras áreas sensório-motoras, também pode estar implicado no comprometimento da memória, bem como o comprometimento da atenção e da função executiva[95]. As funções cognitivas relacionadas ao córtex pré-frontal, como memorização e fluência verbal, são frequentemente prejudicadas na sepse, podendo provocar ansiedade, depressão e transtorno de estresse pós-traumático[95].

Nos modelos pré-clínicos de sepse foram identificados o comprometimento cognitivo desde as primeiras horas após a sepse até vários meses após a recuperação[9,96]. Sendo que as formas mais comuns de comprometimento cognitivo foram: comprometimento da memória aversiva, aprendizagem, atividades locomotoras e exploratórias, memórias de curto e longo prazo, comportamento depressivo, comportamento parecido com ansiedade e comportamento semelhante à anedonia[9].

No que se refere ao comportamento do tipo depressivo, sabe-se que ratos sobreviventes a sepse, após 10 e 30 dias, apresentam aumento no tempo de imobilidade no teste de natação forçada, sugerindo um “comportamento do tipo depressivo” com aumento dos níveis circulantes de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol[97]. Assim, uma resposta aguda ao estresse como na sepse, envolve a liberação de catecolaminas a partir de neurônios simpáticos e, em poucos minutos, a estimulação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) com elevação dos glicocorticóides e estímulo a inflamação[98,99]. Ainda não há tratamento direcionado à neuroinflamação ou ao estresse oxidativo para prevenir ou reduzir a disfunção cognitiva e que melhore o desempenho da memória ou parâmetros do tipo depressivo na sepse[18]. Sendo assim é de grande interesse avaliar novos tratamentos na sepse que apresentem benefício para o desfecho comportamental na doença[100]. Um dos mecanismos que pode estar relacionado a progressão de danos neurológicos na sepse é a via da quinurenina que é capaz de gerar metabolitos tóxicos em processos inflamatórios que induzem a lesão neurológica[18].

1.1.6 Via das quinureninas

Na sepse, a inflamação é capaz de alterar diferentes sistemas de neurotransmissores, como o sistema serotoninérgico[101]. Um dos precursores da via serotoninérgica é o aminoácido triptofano, um precursor de numerosos compostos neurologicamente ativos que é o ponto de partida para a biossíntese da serotonina[17]. Em processos inflamatórios, apenas 5% do triptofano é direcionado para a via serotoninérgica, os outros 95% seguem a via da quinurenina e os metabólitos gerados pela via da quinurenina têm papéis fisiopatológicos importantes, mas quando esta via esta desregulada também pode ser responsável por lesões neurológicas em doenças inflamatórias[18].

O triptofano é um aminoácido essencial derivado totalmente de fontes dietéticas e este aminoácido pode ser metabolizado em quinurenina pela enzima TDO ou pela IDO nas células do sistema imunológico e do cérebro[102,103.]

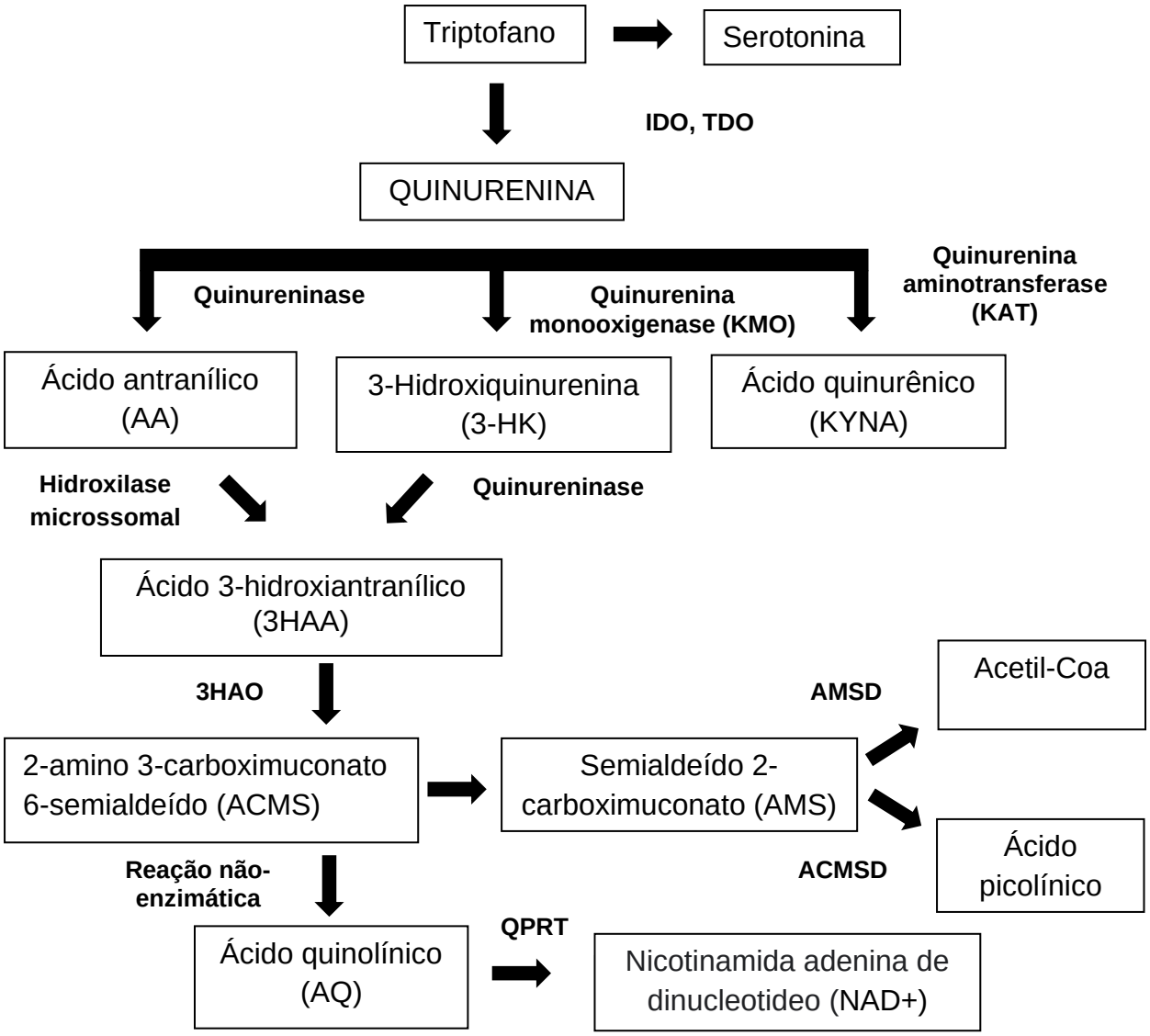
Como pode ser observado na Figura 5, a quinurenina é o primeiro intermediário estável da via e após ser formada, pode sofrer metabolização por 3 mecanismos e em condições fisiológicas[104]:

1) Pode ser catalizada pela enzima quinureninase à Ácido Antranílico (AA)[104].

2) Ainda pode ser metabolizada pela enzima quinurenina monooxigenase (KMO) uma enzima expressa em micróglia[105] e capaz de produzir um radical livre neurotóxico a 3-hidroxiquinurenina (3-HK)[106,107]. Esta enzima tem sido estudada em doenças neurológicas como esquizofrenia, onde ocorre a disfunção do KMO que faz com que a produção de Ácido Quinolínico (AQ) seja menos eficiente, desviando o metabolismo da via da quinurenina para a formação do composto ácido quinurênico (KYNA)[108–110].

3) E por último a quinurenina pode ser metabolizada em KYNA através da quinurenina aminotransferase (KAT)[104]. O KYNA é um neuroprotetor endógeno que normalmente está presente no cérebro em concentrações nanomolares podendo atuar como um antioxidante reduzindo o estresse oxidativo, diminuindo os danos às proteínas e aos lipídios[111]. Ainda é um antagonista dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e pode modular os efeitos neurotóxicos do AQ[110].

Figura 5 - Representação da via da quinurenina.



Fonte: Adaptado de Bie et al,[104].

O 3-HK é um metabólito importante na via da quinurenina, pois ele mesmo em pouca quantidade pode causar neurotoxidade por meio da indução de estresse oxidativo sendo o córtex cerebral e o corpo estriado mais sensíveis a ação do 3-HK[112]. Além disso, seu excesso também está associado a sintomas depressivos[113]. Não só por causa da superprodução de EROs mas também por causa do aumento da atividade da monoamina oxidase, que reduz os níveis cerebrais de catecolaminas e serotonina[114].

O metabólito 3-HK pode ser metabolizado pela quinureninase em ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) assim como o AA pode ser metabolizado pela hidroxilase microssomal formando o mesmo composto[104]. O metabólito 3HAA da via da

quinurenina é uma neurotoxina e ainda pode desempenhar um papel na imunorregulação[115]. Além disso, é um gerador de radicais livres (O^{2-} e H_2O_2) mas que na presença de cobre também pode atuar como um antioxidante[116].

Subsequentemente, o 3HAA é metabolizado pelo 3-hidroxiantranílico-3,4- dioxigenase (3HAO) em 2-amino-3-carboximuconato-6-semialdeído (ACMS), que pode ser ativamente metabolizado em semialdeído 2-carboximuconato (AMS) ou forma o AQ em uma reação não-enzimatica[104]. Ainda o AMS pode ser metabolizado por semialdeído 2-aminomucônico desidrogenase (AMSD) para resultar em acetil-CoA ou pode sofrer a metabolização pela semicardeído descarboxilase aminocarboximuconato (ACMSD), tornando-se ácido picolínico[117].

O ácido picolínico um ácido monocarboxílico, é um neuroprotetor endógeno e um quelante natural de ferro e zinco[118]. Os dados da literatura sobre este ácido focam principalmente em suas propriedades quelantes eficientes[118]. No entanto, tem-se estudado quanto a suas propriedades inibitórias e excitatórias no cérebro e se sabe que aumenta a atividade convulsiva e potencialmente pode desempenhar um papel na patogênese da epilepsia[119].

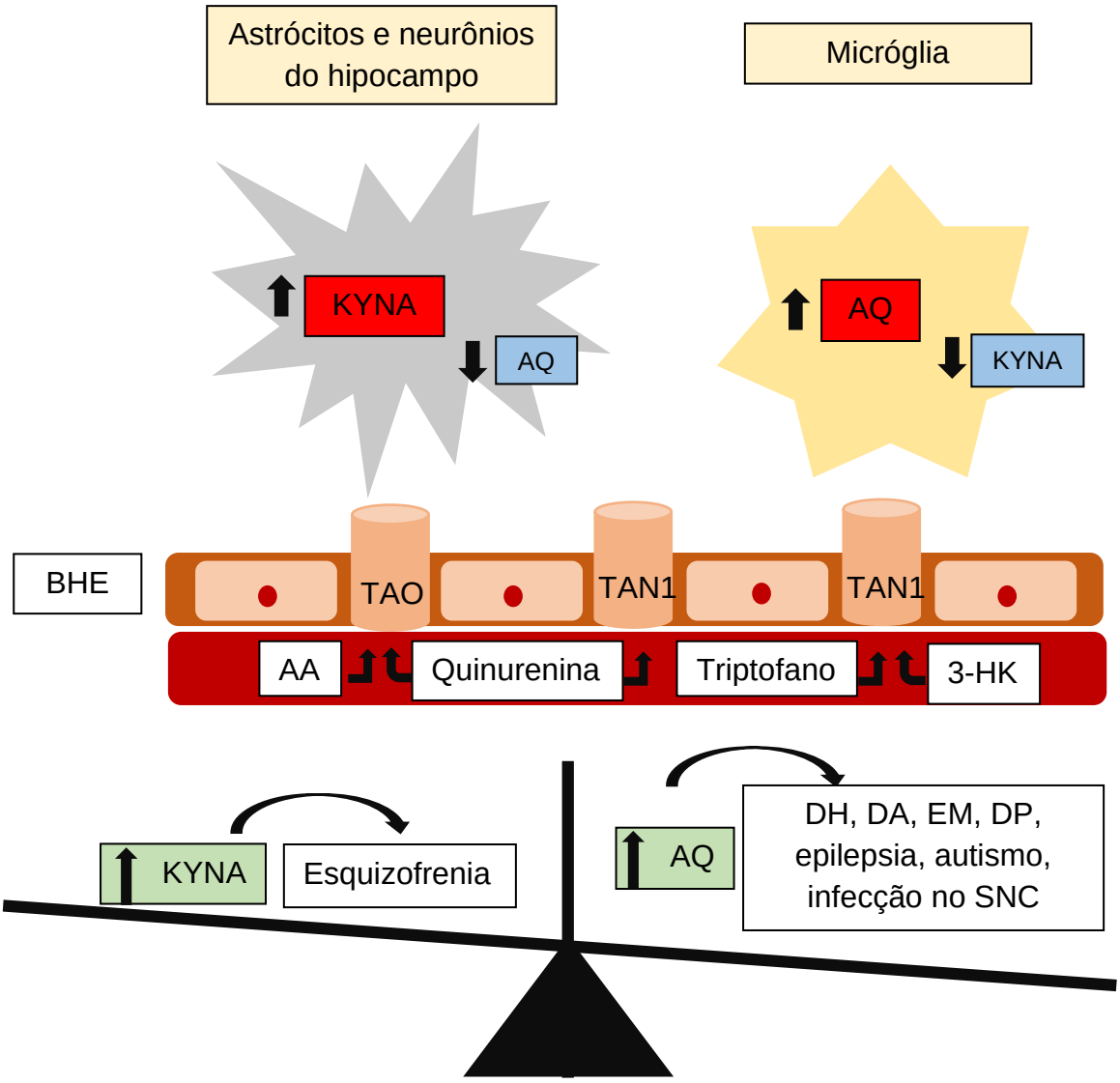
O AQ é um agonista endógeno do receptor de NMDA e no cérebro, as concentrações de AQ são normalmente mais baixas em comparação com os tecidos sanguíneo e sistêmico[120]. No entanto, durante uma resposta imune, seja sistêmica ou central, os níveis de AQ aumentam drasticamente[120]. O AQ como agonista de NMDA, pode aumentar neurotoxicidade pela hiperativação do receptor NMDA, levando ao aumento do influxo de cálcio e a síntese de EROs induzindo o estresse oxidativo[121]. Nesse sentido, foi descoberto que o AQ causa lesões neuronais citotóxicas, com isso o estudo deste composto se tornou centrado em distúrbios associados a danos e degeneração neuronal[122]. O AQ ainda é catalisado pelo quinolinato de fosforibosil transferase (QPRT) formando nicotinamida adenina de dinucleotideo (NAD) que atua como um cofator para várias enzimas envolvidas no metabolismo da energia celular e a respostas adaptativas das células ao estresse bioenergético e oxidativo, e sua deficiência, afeta tecidos que precisam de alta energia celular, como o intestino e o cérebro[117].

Entre os metabólitos mencionados acima, a quinurenina, 3-HK e AA passam através da BHE[123]. E mais de 60% da quantidade central de quinurenina é entregue ao cérebro a partir da circulação periférica[124].

Como pode ser observado na Figura 6, o triptofano e 3-HK podem ser transportados a partir da circulação periférica para o cérebro pelo transportador de aminoácidos neutros 1 (TAN-1). Já o AA pode ser transportado por transportadores de ânions orgânicos (TAO) e ainda a quinurenina pode ser transportada pelos dois tipos de transportadores[125,126].

Tratando-se da formação desses metábólitos em células cerebrais no hipocampo e em astrócitos é onde a maior parte da KYNA do SNC é produzida[117]. Em relação às micróglias, a ativação da via da quinurenina resulta em um aumento da síntese de 3-HK um dos principais inibidores da neurogênese[124]. Ainda, a micróglia é a principal produtora de AQ no SNC, e este composto atua como um agente neurotóxico em astrócitos[117].

Figura 6 - Via da quinurenina no SNC



Legenda: DH: Doença de Huntington, DA: Doença de Alzheimer, ELA: esclerose lateral amiotrófica, EM: Esclerose múltipla, DP: Doença de Parkinson.
Fonte: Adaptado de Modoux et al e Mor et al[117,124]

Os componentes da via da quinurenina podem ser fundamentais na etiologia de distúrbios psiquiátricos e neurológicos[110]. Qualquer desequilíbrio entre a KYNA e o AQ leva a repercussões patológicas como pode ser observado na Figura 6, o acúmulo de AQ pode estar ligado a muitos distúrbios neurológicos, como doença de Parkinson, autismo, epilepsia, doença de Huntington, esclerose múltipla, doença de Alzheimer e depressão[117]. Já o acúmulo de KYNA está ligado a esquizofrenia[117].

Tratando-se do dano que diz respeito a sepse, verificou-se que a enzima IDO está elevada e tem relação com o aumento da severidade da doença, além de estar associada com uma maior mortalidade[127]. Ainda se sabe que o bloqueio dessa enzima é capaz de proteger camundongos do choque endotoxêmico induzido por LPS[19,128,129]. Esta enzima também é um mediador de hipotensão na endotoxemia[130] e sua alta atividade predita severidade e fatalidade em bacteremias[131]. No tratamento de camundongos com inibidor da IDO, foi verificado uma redução na mortalidade por peritonite e sepse[132] e ainda este inibidor gera proteção contra comprometimento cognitivo[16]. Recentemente foi demostrado que a vitamina B6 consegue atenuar a ativação da IDO preservando triptofano e diminuindo níveis cerebrais de quinurenina na sepse[20,133].

A IDO assim como a TDO, catalisam a primeira reação na via da Quinurenina. No entanto, no que diz respeito aos efeitos neurotóxicos da via, estudos tem se concentrado principalmente em IDO, mas um corpo crescente de evidências mostram que o efeito da ativação de TDO pode ser importante na potencialização da neurotoxicidade causada pela via da quinurenina[134].

1.1.6.1 Triptofano dioxigenase (TDO)

Além da IDO, a primeira etapa da via da quinurenina também pode ser catalisada por TDO[135]. O TDO pode ser regulada por citocinas inflamatórias e ainda induzida por glicocorticóides[136]. A deficiência de TDO aumenta a concentração de serotonina no cérebro, enquanto a inibição da IDO a reduz[137].

A transcrição do TDO além de ser aumentada pelos glicocorticoides, também é potencializada pelo glucagon, mas inibida pela adrenalina e insulina[135]. Acredita-se ainda que o heme hepático regule a indução de glicocorticoides e a expressão gênica de TDO[138].

A busca por inibidores da TDO foi inicialmente impulsionada pela terapia da depressão, mas já nos últimos anos foi considerada um alvo promissor tanto no câncer quanto em outras doenças neuropsiquiátricas[139]. No câncer foi observado o aumento de expressão de TDO e estudos mostram a sua importância na resistência tumoral[140]. Já as evidências do envolvimento da TDO em doenças cerebrais se concentra na esquizofrenia e a doença de Alzheimer[134].

A TDO pode ser expresso no hipocampo, e está envolvido na regulação da neurogênese, por isso desempenha um papel crucial na formação da memória[141]. Por isso tem-se verificado que a inibição da TDO pode melhorar os déficits comportamentais relacionados à doença de Alzheimer e a sua administração oral de longo prazo, restaura os déficits de memória de reconhecimento[142.] A TDO ainda modula o comportamento relacionado à ansiedade em camundongos[141].

Ainda se sabe que a TDO está ativada durante a depressão sendo portanto um dos alvos terapêuticos ideais para o transtorno depressivo[103.] Nesse sentido, a inibição de TDO é um mecanismo compartilhado de um grande número de antidepressivos, diminuindo metabólitos neurotóxicos e atenuando sintomas depressivos[143]. Além disso, a ativação da TDO pode levar à diminuição da disponibilidade de serotonina, já na sua inibição ocorre o aumento da disponibilidade de triptofano para tecidos extra-hepáticos, como o cérebro e ainda normaliza a biossíntese da serotonina no transtorno depressivo[144].

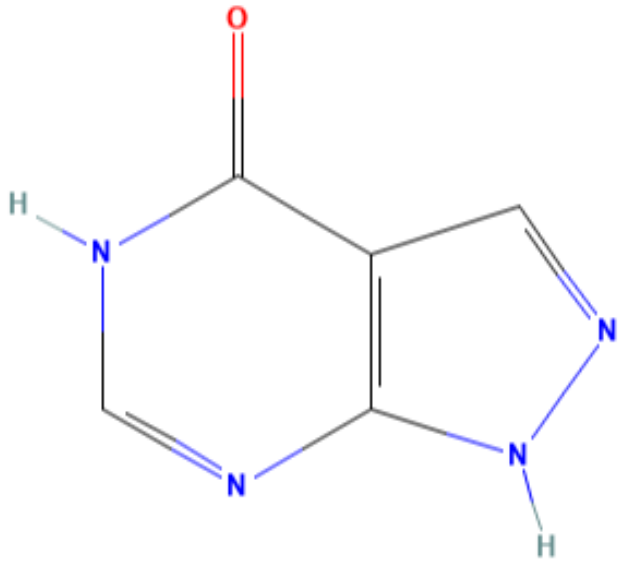
A depressão pode ser acompanhada por ativação imune sistêmica onde ocorre a liberação de citocinas pro-inflamatórias como IL-1, TNF-α e IL-6, que são conhecidas por ativarem o eixo HPA[145]. Nesse sentido, essas condições de estresse também podem aumentar a liberação de glicocorticóides que causa o aumento da atividade da TDO e a sua inibição pode ser importante para diversas condições associadas à neuroinflamação e ativação do eixo HPA como ocorre na depressão assim como na sepse[146.]

Muitos medicamentos e produtos químicos inibem a TDO, como por exemplo o alopurinol[147]. Este composto ainda não é utilizado para transtornos neuropsiquiátricos, no entanto o uso desse medicamento tem sido sugerida na literatura[148].

1.1.6.2 Alopurinol

O alopurinol, é um isômero estrutural da purina, como pode ser observado na figura 7[149].Em 1966 foi aprovado para terapia de redução de urato e o tratamento de gota pela Administração de Comida e Medicamentos (FDA) dos EUA e tornou-se o medicamento de primeira linha no tratamento desta patologia[150].

Figura 7 – Estrutura química do alopurinol



Fonte: National Center for Biotechnology Information[151]

O alopurinol é absorvido *in vivo* rapidamente e tem meia-vida no plasma de 1 a 2 horas em indivíduos com função renal normal[152]. Ainda tem um alto metabolismo após administração oral, podendo atingir o pico das concentrações plasmáticas em 30 a 60 minutos[153]. O alopurinol é rapidamente convertido no metabólito ativo que mantem o mesmo padrão terapêutico o oxipurinol e este composto tem uma meia-vida mais longa, de 14 a 30 horas[154].

No choque séptico, o tratamento com alopurinol foi capaz de produzir uma redução significativa na resistência vascular periférica total, um aumento no débito cardíaco, na concentração de glicose no sangue e na concentração de lactato arterial[155]. Já o pré-tratamento com alopurinol antes de ser induzido o choque séptico, reduz a apoptose de hepatócitos e níveis de quimiocinas em fígado de camundongos endotoxêmicos[156].

Este composto também já foi estudado como um atenuador de estresse e promotor de atividade antidepressiva em modelo de exposição repetida ao estresse[157]. O alopurinol também atravessa facilmente a barreira hematoencefálica[158]. Ainda, tem capacidade de eliminação de EROs e pode diminuir o estresse oxidativo[159]. Tal resposta sobre a sua efetividade frente ao estresse oxidativo possui relação com a inibição da via da quinurenina. Considera-se que o alopurinol faça a

inibição do TDO, impedindo a conjugação do mesmo com o seu cofactor heme, mantendo-o assim na sua forma inativa[160].

Por tudo o que foi mencionado, sabe-se que o comprometimento do SNC na sepse está relacionado com a ativação da via da quinurenina, no entanto, não houve investigações até o momento que avaliem o papel da ativação da TDO sobre as alterações cerebrais agudas e de longo prazo relacionadas à sepse.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da inibição do TDO sobre o dano neurológico agudo e o dano cognitivo a longo prazo em modelo de sepse experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da inibição de TDO sobre o nível de interleucina 10 (IL-10) e IL-6 no córtex pré-frontal e hipocampo em 24 horas após a indução de sepse experimental;
- Analisar o efeito da inibição de TDO sobre a ativação dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e do SDH no córtex pré-frontal e hipocampo em 24 horas após os ratos serem submetidos ao modelo de sepse experimental;
- Investigar o efeito da inibição de TDO sobre os níveis de MPO no córtex pré-frontal e hipocampo em 24 horas e 10 dias após a indução de sepse experimental;
- Verificar o efeito do da inibição de TDO sobre os níveis de marcadores de dano oxidativo em lipídios e proteínas no córtex pré-frontal e hipocampo em 24 horas e 10 dias após os ratos serem submetidos ao modelo de sepse experimental;
- Avaliar o efeito da inibição de TDO sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no córtex pré-frontal e hipocampo em 24 horas e 10 dias após a indução de sepse experimental;
- Analisar o efeito da inibição de TDO sobre os níveis de nitrito/nitrato (N/N) no córtex pré-frontal e hipocampo 24 horas e 10 dias após a indução de sepse experimental.
- Verificar o efeito da inibição do TDO sobre a memória de curto e longo prazo dos ratos em 10 dias após a indução de sepse experimental;
- Avaliar o efeito da inibição de TDO sobre o comportamento do tipo depressivo dos ratos em 10 dias após a indução de sepse experimental;
- Verificar o efeito da inibição de TDO sobre a sobrevida dos ratos durante 10 dias após a indução de sepse experimental.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental com modelo animal de sepse polimicrobiana induzida por ligação e perfuração cecal (CLP do inglês, *Cecal ligation and puncture*).

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Este projeto foi realizado no Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos (NEUROimet) da UNISUL, Tubarão/SC. Os reagentes utilizados para as análises bioquímicas foram: ácido tiobarbitúrico, 1,1,3,3 - tetrametoxipropano, brometo de hexadeciltrimetilamónio, dinitrofenilhidrazina, epinefrina, catalase de fígado bovino, albumina bovina, sulfanilamina, azida sódica, naftil etilenodiaminadicloridrato e reagente de Griess (Sigma, St. Louis, USA), ácido clorídrico, álcool etílico, acetato de etila, hidróxido de sódio, carbonato de sódio, ácido tricloroacético e peróxido de hidrogênio, ácido aminoacético (Labsynth, São Paulo, Brasil). Foram ainda utilizados kits para citocinas da marca R&D Systems®.

Os seguintes equipamentos foram utilizados: agitador magnético (752A, Fisatom), balança analítica (M214A, BEL engeening), banho-maria (DeLeo equipamentos laboratoriais), espectrofotômetro (NOVA1103, Novainstruments), espectrofotômetro (U2010, Hitachi), estufa de secagem (DeLeo), Freezer (F21, Eletrolux), homogeneizador potter (Marconi), leitor de microplaca (TP reader, Thermo Plate), medidor de pH (pHB500, ION), microcentrífuga refrigerada (NT805, Novatecnica), osmose reversa (RO/0520, Permution), refrigerador (R270, Eletrolux), Vortex (Biomixer).

3.3 ANIMAIS

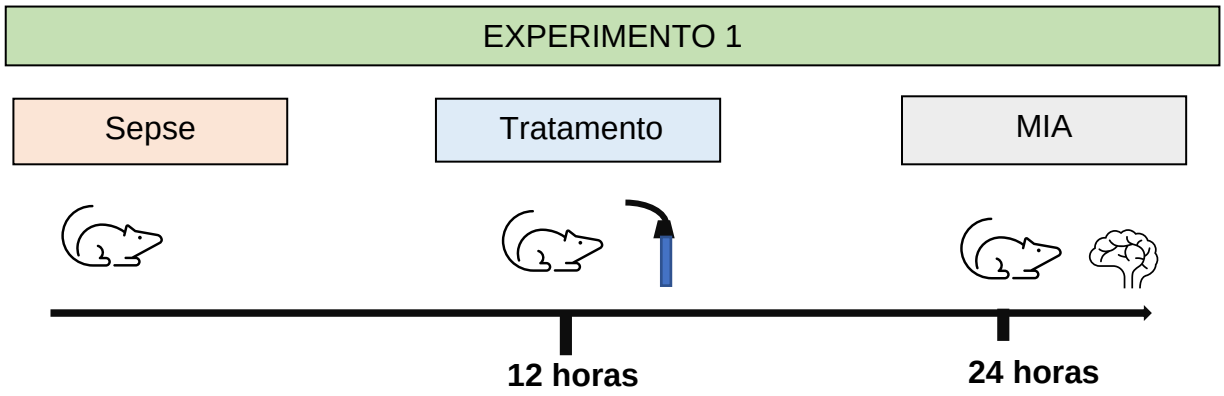
Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com 60 dias de idade fornecidos pela Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no biotério de experimentação da Universidade do Sul de Santa Catarina onde foram acondicionados em gaiolas com livre acesso à água e ração (dieta padrão para animais de laboratório - NUVILAB CR-1®, Brasil). Os animais foram alocados em 4

animais por gaiola, alojadas em ambiente que possui sistema de exaustão de ar, com controle de luminosidade ciclo claro e escuro (12/12 horas) como também controle de temperatura do ambiente (22 ± 1º C) e umidade relativa (45-55%).

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

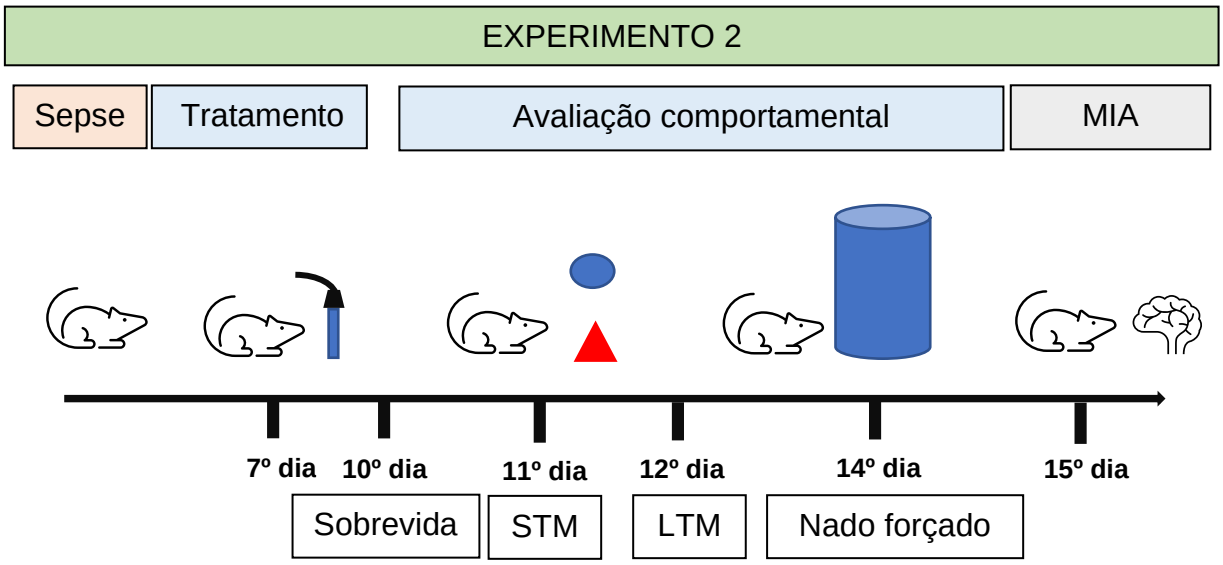
Este estudo foi dividido em duas etapas, sendo a primeira etapa (experimento 1) demostrada na Figura 8 para determinação as alterações cerebrais agudas. A segunda etapa (experimento 2) demostrado na Figura 9, foi realizada com o objetivo de avaliar a sobrevida, dano cognitivo, comportamento depressivo e alterações bioquímicas cerebrais a longo prazo.

Figura 8 - Representação do Experimento 1



No experimento 1 foi feita a sepse experimental pelo método de CLP e o alopurinol dissolvido no veículo (água) foi administrado na dose de 20 mg / kg por gavagem[161] ou veículo (1mL / kg), 12h após a cirurgia. Em 24 horas após a indução da sepse foi feita a morte indolor assistida (MIA) para retirada do córtex pré-frontal e o hipocampo. Nas estruturas cerebrais retiradas foi realizada a avaliação dos parâmetros neuroquímicos e neuroinflamatórios agudos como: avaliação das citocinas inflamatórias, infiltração por neutrófilos, avaliação do estresse oxidativo e avaliação da cadeia respiratória mitocondrial. A avaliação foi feita em 4 grupos experimentais (sham + veículo, sham + alopurinol, CLP + veículo, CLP + alopurinol,) com 7 animais por grupo.

Figura 9 – Representação temporal do Experimento 2



Legenda: STM – memória de curta duração, e LTM – memória de longa duração

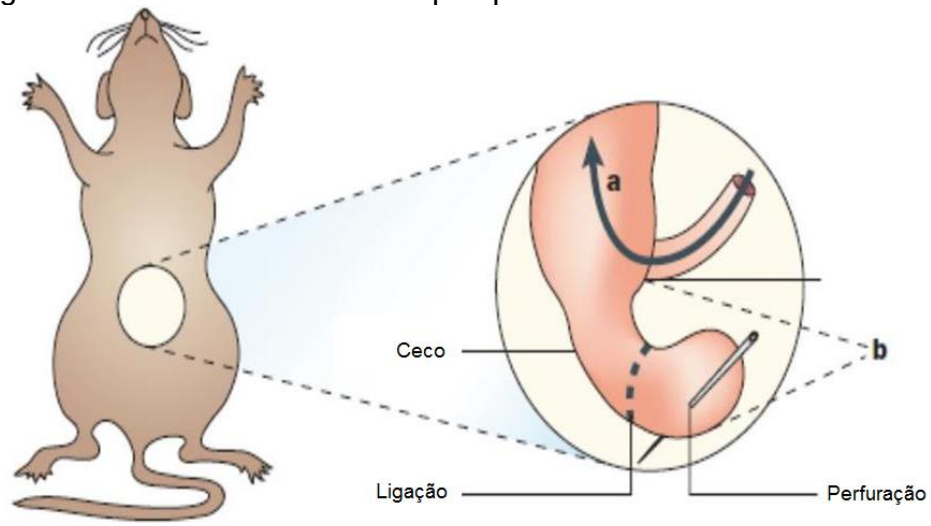
No experimento 2 foi feito a sepse experimental pelo método de CLP. No primeiro dia o tratamento com alopurinol ou veículo foi administrado 12 horas após a sepse e nos dias seguintes a cada 24 horas até o 7º dia. O tratamento foi feito até o 7º dia como reproduzido na literatura para evitar efeitos tóxicos[158,161]. A sobrevida foi avaliada logo após a cirurgia de indução de sepse no tempo de 6, 12 e 24 horas e após o segundo dia, foi feita a avaliação diária até o 10º dia. No 10º dia foi feita a habituação e no 11º dia foi realizado o treino sendo que após 1,5 horas foi avaliado a memória de curta duração (STM do inglês, *Short-term memory*). No 12º dia foi avaliada a memória de longa duração (LTM do inglês, *Long-term memory*), já no 13º dia foi realizado o treino para o nado forçado e no 14º dia, foi avaliado o comportamento depressivo através do nado forçado. No 15º dia foi realizada a morte indolor assistida e retirada do córtex pré-frontal e hipocampo para avaliação do dano neurológico a longo prazo na qual foi avaliado a infiltração por neutrófilos e o estresse oxidativo. Este experimento foi feito em 4 grupos experimentais (sham + veículo, sham + alopurinol, CLP + veículo, CLP + alopurinol,) sendo que cada grupo sham foi composto por 12 animais e cada grupo CLP foi composto por 18 animais.

3.5 TÉCNICAS

3.5.1 Modelo experimental de sepse

Como pode ser observado na Figura 10, o modelo experimental utilizado foi o de sepse induzido pela técnica de CLP, que consiste na ligação e perfuração do ceco para que o ocorra o extravasamento de conteúdo fecal na cavidade abdominal e assim gere uma resposta imune exacerbada[162]. Os animais foram anestesiados com 80mg/kg quetamina e 10mg/kg xilazina por via intraperitoneal e sob condições assépticas foram submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal onde foi exposto o ceco e intestino adjacente. O ceco foi ligado 50% abaixo da junção íleo-cecal com um fio de seda 3,0, em seguida foi feito a perfuração do ceco com uma agulha número 14G. O ceco então foi suavemente espremido para extrusão fecal através do local da perfuração. Após o ceco ser devolvido a cavidade abdominal, os planos cirúrgicos foram fechados e os animais foram mantidos em ambiente aquecido e observados por duas horas. Todos os animais receberam suporte básico com reposição volêmica de 50mL/kg de NaCl 0,9% estéril por via subcutânea (sc), analgésico (dipirona 80 mg/kg via sc), antibiótico (ceftriaxona 30mg/kg por via sc) logo após o CLP e ceftriaxona 30mg/kg por via sc após 12 horas. Como controle, foram utilizados animais submetidos à laparotomia sem ligação ou perfuração cecal denominados de sham, esses animais receberam também a reposição volêmica, dipirona e antibiótico. Para minimizar a variabilidade entre os experimentos o procedimento de CLP foi sempre realizado com o mesmo investigador.

Figura 10 - Modelo animal de sepse por CLP



Legenda: a) Válvula ileocecal onde o intestino delgado se junta ao intestino grosso. B) Ceco. Fonte: Adaptado de Buras, JA., Holzmann,B., Sitkovsky, M.,[163]

3.5.2 Tratamentos

O alopurinol medeia seus efeitos na inibição do TDO, impedindo a conjugação do TDO com seu cofator heme, mantendo-o assim em sua forma inativa[160]. Nesse experimento, o alopurinol foi dissolvido no veículo (água) imediatamente antes do uso e os animais receberam alopurinol (20 mg / kg por gavagem)[161] ou veículo (1mL / kg por gavagem), 12h após a cirurgia e por um período de 7 dias a cada 24 horas. A avaliação foi feita em 4 grupos experimentais (CLP + veículo, CLP + alopurinol, sham + veículo, sham + alopurinol) com 7 animais por grupo no experimento 1. E no experimento 2 foram utilizados os mesmos grupos, no entanto cada grupo sham foi composto por 12 animais e cada grupo CLP foi composto por 18 animais, já as análises laboratoriais foram feitas com os sobreviventes da sepse.

3.5.3 Morte indolor assistida e coleta de amostras biológicas

A MIA foi realizada nos animais com 160mg/kg quetamina, 20mg/kg xilazina e 15mg/kg lidocaina por via intraperitoneal seguida de decapitação, e retirada das estruturas cerebrais (córtex pré-frontal e o hipocampo) que foram isolados para análise bioquímica 24 horas após CLP no experimento 1 e após testes comportamentais no experimento 2. O procedimento foi realizado pelo veterinário responsável do biotério da UNISUL.

3.5.4 Marcadores inflamatórios

Foi utilizado a técnica de Ensaio imuno-enzimático (ELISA do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) com kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, MN) para dosar as citocinas IL-6 e IL-10 no córtex pré-frontal e hipocampo 24 horas após a indução da CLP. Os resultados foram expressos em pg/mg proteína.

3.5.5 Atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO foi avaliada como um indicativo do infiltrado de neutrófilos tecidual. O tecido encefálico foi homogeneizado (50 mg/ml) em 0.5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugado a 15.000 xg durante 40 min. Ao sobrenadante

foi adicionada uma solução de tetrametilbenzidina (1.6 mM) e 1 mM H_2O_2. A atividade da MPO foi mensurada espectrofotômetro em 650 nm a 37ºC e expressa em atividade de MPO (U/mg proteína)[164].

3.5.6 Nitrito e Nitrato (N/N)

A concentração de N/N foi determinada pela reação de Griess. A reação foi realizada pela adição do reagente de Griess [1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico e 0,1% de dicloridrato de N-1-naftiletilenodiamina em H_2O bidestilado (solução NED)] e cloreto de Vanadium (III) à estrutura cerebral previamente homogeneizada em tampão fosfato. Após 1h de incubação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a leitura da absorbância foi realizada a 550nm em espectrofotômetro[165]. Os resultados serão expressos em nmol/mg de proteína

.

3.5.7 Avaliação do estresse oxidativo.

3.5.7.1 Avaliação de dano aos lipídios

O nível de dano oxidativo em lipídios foi avaliado pela técnica de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS do inglês, *Thiobarbituric acid reactive substances*). As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato e desproteinizadas com o ácido tricloroácetico 10% com centrifugação à 1.000 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado ácido tiobarbitúrico 0,67% e em seguida foi incubado a 100°C em banho-maria por 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em 535nm em espectrofotômetro utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo[166]. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído nmol/mg de proteína.

3.5.7.2 Avaliação de dano a proteínas

O nível de dano oxidativo às proteínas foi quantificado pela reação dos grupamentos carbonilados com dinitrofenilhidrazina. As proteínas foram precipitadas com ácido tricloroácetico 20% (Vetec) e redissolvidas em dinitrofenilhidrazina. A leitura

da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 370nm[167]. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

3.5.7.3 Atividade da enzima antioxidante SOD

A atividade da SOD foi medida com base em sua capacidade de inibir espontaneamente a oxidação da adrenalina em adrenocromo a 32º C[168]. As amostras teciduais foram homogeneizadas em 1 mL de tampão glicina e centrifugadas por 10 min em 3000 rpm, em temperatura ambiente. O reagente branco foi preparado a partir da mistura de 10 µL de catalase na concentração de 0,0024 g/mL com 970 µL de tampão glicina a 32 ºC. Após, foi adicionada a quantidade de 17 µL de adrenalina 60 mM. A leitura do reagente foi será realizada a cada 10 segundos, durante 180 segundos, a fim de determinar a curva de calibração. Este processo foi repetido após a leitura de quatro amostras e sempre que houve a troca de reagentes. As amostras foram preparadas a partir da mistura de 10 µL de catalase 0,0024 g/mL, 3, 5 ou 7 µL de amostra e 970 µL de tampão glicina a 32 ºC. A leitura da amostra foi realizada a cada 10 segundos, durante 180 segundos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de lâmpada de deutério, em cubetas de plástico, a 480 nm. A atividade da SOD foi expressa em U de SOD/mg de proteína

3.5.7.4 Atividade da enzima antioxidante CAT

A atividade da CAT é diretamente proporcional à taxa de decomposição do H_2O_2. A reação utiliza o método que emprega H_2O_2 que deve ser convertido pela CAT em H_2O e O_2 [169]. O tecido cerebral foi homogeneizado em tampão de fosfato 50 mmol/L (pH 7,0), e a suspensão resultante foi centrifugada a 3000rpm durante 10 min. Uma alíquota de 100 µl da amostra foi adicionada a 1000 µl da mistura de substrato que continha 0,3 ml de H_2O_2 em 50 ml de tampão ao fosfato 0,05 M (pH 7,0). As absorbâncias foram registradas em 240 nm nos tempos 0, 30 e 60 segundos após o início da reação. Uma curva padrão foi estabelecida utilizando CAT purificada (Sigma, MO) em condições idênticas. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

3.5.8 Avaliação da atividade da SDH

A atividade da SDH foi determinada de acordo com o método de Fischer e colegas, medindo a diminuição da absorbância devido à redução de 2,6-dicloro-indofenol (DCIP) em 600 nm com 700 nm como comprimento de onda de referência (e = 19,1 mM^{-1} cm^{-1}) na presença de metossulfato de fenazina (PMS). A mistura de reação que consiste em fosfato de potássio 40 mM, pH 7,4, succinato 16 mM e 2,6-DCIP 8 mM foi pré-incubada com proteína homogenada 40-80 µg a 30 ° C por 20 min. Posteriormente, azida de sódio 4 mM, rotenona 7 µM e 2,6-DCIP 40 µM foram adicionados e a reação foi iniciada por uma adição de PMS 1 mM e foi monitorada por 5 min[170]. Os resultados foram expressos em nmol. min^{-1} mg de $proteína^{-1}$.

3.5.9 Avaliação dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial

O córtex pre-frontal e hipocampo foram homogeneizados com tampão SETH (250 mM sacarose, 2 mM EDTA, 10 mM Trisma base, 50 IU/ml heparina), pH 7,4. O homogenato foi centrifugado a 3000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante foi mantido a -70ºC até a realização das análises.

A atividade do complexo I foi avaliada pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto pela diminuição da absorbância. Ao meio será adicionado tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,4), NADH 14mM, rotenona 1,0 mM, ferrocianeto (FeCN 10 mM) e proteínas do homogenizado. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a cada 60 segundos, durante 3 min, em 420 nm a 25 °C[171].

A atividade do complexo II foi medida pela diminuição da absorbância causada pela redução do DCIP. O meio de incubação foi constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), succinato de sódio (16 mM) e DCIP (8 µM) e as proteínas do homogeneizado incubados a 30°C por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado ao meio 4 mM de azida sódica e 7 mM de rotenona e a reação iniciará com adição de 40 mM de DCIP. As absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 600 nm[170].

A atividade do complexo II-III foi medida pelo aumento da absorbância causado pela redução do citocromo c. O meio de reação, constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), contendo succinato de sódio (16 mM), foi pré-incubado com proteínas do homogeneizado a 30°C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 4 mM de azida

sódica e 7mM de rotenona e a reação se iniciará pela adição de 0,6 µg/mL de citocromo c e as absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 550 nm[170].

A atividade do complexo IV foi determinada de acordo com a técnica descrita por Rustin et al[172] e calculada pela diminuição da absorbância causada pela oxidação do citocromo c reduzido. O meio de incubação foi constituído por tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0), dodecil-maltisídeo (0,6 mM) e proteínas (homogeneizado). A reação foi iniciada com a adição de 0,7 µg de citocromo c reduzido. A atividade do complexo IV foi medida a 25°C por 10 minutos e as leituras foram feitas a 550 nm[172]. Os resultados foram expressos em nmol. min-1 mg de proteína-1.

3.5.10 Análise da concentração de proteínas totais

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método descrito por Lowry, Rosenbruogh e Randal, baseado na reação de Folin-Ciocalteu. Nessa análise foi adicionado 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteau 2 N na amostra com 1,0 mL de água. Após um período de 2 a 5 minutos, foi acrescentado ao tubo de ensaio 0,5 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 10%. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 760 nm. Esta dosagem foi usada para normalização dos resultados de todas as dosagens neuroquímicas[173].

3.5.11 Análise de sobrevida

Na avaliação da sobrevida, os animais foram observados diariamente durante 10 dias após indução de sepse para verificar a taxa de sobrevida[174].

3.5.12 Testes comportamentais para avaliação de dano cognitivo

Os testes comportamentais iniciaram em 10 dias após a cirurgia, onde os animais foram testados de forma individual.

3.5.12.1 Avaliação de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento objetos foi realizado em aparato de campo aberto, medindo 40 x 60 cm, com 50 cm de altura e com o piso dividido em 12 quadrados iguais. Todos os animais foram submetidos a uma sessão de habituação, onde foram autorizados a explorar livremente o campo aberto por 5 minutos. Nenhum objeto foi colocado na caixa durante o teste de habituação.

Fase de treinamento: O treinamento foi realizado 24 horas após a habituação, onde os ratos foram colocados individualmente por 5 minutos no campo, no qual dois objetos idênticos (objetos A1 e A2) foram posicionados em dois cantos adjacentes, a 10 cm das paredes.

STM: O teste de memória de reconhecimento de curto prazo foi realizado 1,5 horas após o treinamento, os ratos exploraram o campo aberto por 5 min na presença de um objeto familiar (A1) e um novo objeto (B).

LTM: O teste de memória de reconhecimento de longo prazo foi realizado 24 horas após o treinamento, o objeto B foi substituído por um novo objeto (C), permitindo a exploração livre do animal por 5 minutos novamente.

A memória de reconhecimento foi definida como cheirar (explorar o objeto a 3–5 cm de distância) ou tocar o objeto com o nariz e/ou patas dianteiras. Um índice de reconhecimento calculado para cada animal é relatado como a razão TB / (TA1 + TB) para teste de memória de curto prazo e TC / (TA1 + TC) para a memória de longo prazo (TA1 = tempo gasto explorando o objeto familiar A1; TB = tempo gasto explorando o novo objeto B e TC = tempo gasto explorando o novo objeto C) Entre as seções de reconhecimento todos os aparatos foram limpos com etanol 70% para evitar que algum cheiro influencie os resultados[175,176].

3.5.12.2 Teste de nado forçado

O teste do nado forçado é utilizado para avaliação da atividade antidepressiva, cuja imobilidade reflete o estado de baixo humor relacionado com a impossibilidade de escape durante a situação experimental[177]. O protocolo foi realizado em um recipiente cilíndrico, com uma coluna d´água de 40 cm onde os animais não conseguem tocar o fundo e nem escapar, à temperatura de 25 ºC (± 1 ºC). Durante o treino cada animal permanece na água durante 5 minutos e são recolocados no cilindro 24 horas depois na sessão de teste por 5 minutos, durante esta sessão seu comportamento é registrado em fita de vídeo para análise. Os comportamentos

executados são classificados em: natação e imobilidade. O comportamento de natação é caracterizado por movimentos, usualmente horizontais através do recipiente; e a imobilidade é definida quando nenhuma atividade adicional é realizada, com os animais executando movimentos mínimos para manter suas cabeças acima da água[178]. Ao terminar o teste cada animal foi retirado do cilindro e seco com toalha. Entre as sessões, a água do cilindro foi escoada e o cilindro higienizado com álcool (70 %).

3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Todas as análises foram executadas pelo programa estatístico GraphPad Prism® versão 8.0. Para avaliação da distribuição dos dados foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas por ANOVA, seguido do teste post hoc de Tukey ou Bonferroni, respectivamente. Os dados da análise comportamental foram expressos como mediana e intervalo interquartil, e as comparações entre os grupos foram realizadas por meio de testes U de Mann-Whitney, enquanto os grupos intraindividuais foram analisados pelo teste de Wilcoxon. A análise de sobrevivência foi avaliada por Kaplan-Meier e teste de log rank. Para todas as análises, foi utilizado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sul de Santa Catarina (CEUA-UNISUL) cujo protocolo é 18.035.4.01.IV (Anexo A).

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.

4. ARTIGO

O artigo intitulado: “Inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase exhibits early and long-term neuroprotection in an animal model of sepsis” foi submetido em outubro de 2021 para a revista *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry,* conforme suas diretrizes e está em revisão.

Inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase exhibits early and long-term neuroprotection in an animal model of sepsis

Kiuanne Lino Lobo Metzker[1], Khiany Mathias[1], Tais Denicol[1], Thaina Cidreira[1], Lucinéia Gainski Danielski[1], Sandra Bonfante[1], Larissa Joaquim[1], Marina Goulart da Silva[2], Guilherme Cabreira Daros[2], Elisa Mitkus Flores Lins[3], Fernanda Belle[3], Carolina Giassi Alano[4], Rafaela Tezza Matiola[4], Isabela da Silva Lemos[4], Gislaine Tezza Rezin[1], Rafael Mariano de Bitencourt[2], Taise Cardoso[1], Franciane Bobinski[3], Emilio Luiz Streck[4], Gislaine Zilli Reus[5], Tatiana Barichello[6,7], Fabricia Petronilho[1]*

[1]Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil;
[2]Behavioral Neuroscience Laboratory, Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil;
[3]Experimental Neuroscience Laboratory (LaNex), Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Palhoca, Brazil;
[4]Laboratory of Experimental Neurology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciuma, SC, Brazil;
[5]Laboratory of Translational Psychiatry, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciuma, SC, Brazil;
[6]Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciuma, SC, Brazil;
[7]Translational Psychiatry Program, Faillace Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX 77054 USA.

*Corresponding author: E-mail: kiuanne@gmail.com

RESUMO

A via das quinureninas é a via metabólica dominante do triptofano que é catalisada pela triptofano-2,3-dioxigenase (TDO) em resposta à inflamação e à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Essa via é regulada positivamente no cérebro séptico, no entanto, a contribuição biológica da inibição de TDO em alterações cerebrais agudas e de longo prazo após a sepse não foi investigada anteriormente. Nesse sentido, objetivamos determinar o envolvimento da atividade do TDO nas alterações cerebrais precoces e tardias após sepse experimental. Ratos Wistar machos com dois meses de idade foram submetidos ao modelo de sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP) ou apenas laparotomia. Os ratos receberam Alopurinol (20 mg/kg via gavage) um inibidor de TDO ou veículo (1ml/kg), 12h após a cirurgia e diariamente por 7 dias. O córtex pré-frontal e hipocampo foram isolados para análises de citocinas, mieloperoxidase (MPO), nitrito/nitrato (N/N), estresse oxidativo, succinato desidrogenase e análises da atividade da cadeia respiratória mitocondrial 24 h após CLP. Um subconjunto de animais foi acompanhado por 10 dias para avaliação de sobrevivência, testes comportamentais e análise de estresse oxidativo. A administração de Alopurinol restaurou a elevação do nível da citocina IL-6 no hipocampo. O alopurinol reduziu o MPO, N/N e danos oxidativos a lipídios e proteínas em ambas as estruturas cerebrais em 24 horas após o CLP, bem como preservou a atividade das enzimas antioxidantes no hipocampo. A diminuição das atividades do complexo I e II foi revertida pela inibição do TDO e o Alopurinol preveniu o comprometimento comportamental. Em resumo, a inibição do TDO foi eficaz na prevenção do comportamento depressivo de longo prazo e do comprometimento da memória, reduzindo a neuroinflamação aguda, o estresse oxidativo e a alteração mitocondrial.

Palavras-chave: sepse, quinurenina, triptofano-2,3-dioxigenase, estresse oxidativo, depressão, comprometimento cognitivo.

ABSTRACT

Kynurenine pathway (KP) is the dominant metabolic route of tryptophan which is catalyzed by tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) in response to inflammation and the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis. This pathway is upregulated in septic brain, however, the biological contribution of TDO inhibition on acute and long-term brain alterations after sepsis has not been previously investigated. In this sense, we aimed at determining the involvement of the TDO activity on early and late brain changes after experimental sepsis. Two-month-old male Wistar rats were submitted to the sepsis model by cecal ligation and perforation (CLP) or laparotomy only. The rats received Allo (20 mg/kg via gavage) a TDO inhibitor or vehicle (1ml/kg), 12h after surgery and daily for 7 days. Prefrontal cortex and hippocampus were isolated for cytokine analyses, myeloperoxidase (MPO), nitrite/nitrate (N/N), oxidative stress, succinate dehydrogenase, mitochondrial respiratory chain activity analyses at 24 h after CLP. A subset of animals was followed for 10 days for survival assessment, behavioral tests and oxidative stress analyiss. The administration of Allo restored the elevation of IL-6 cytokine level in the hippocampus. Allo reduced MPO, N/N and oxidative damage to lipids and protein in both brain structures at 24 hours after CLP, as well as preserved the activity of the antioxidant enzymes in the hippocampus. Decreased complex I and II activities were reverted by TDO inhibition and Allo prevented behavioral impairment. In summary, the TDO inhibition was effective in preventing long-term depressive behavior and memory impairment by reducing acute neuroinflammation, oxidative stress and mitochondrial alteration.

Keywords: sepsis, kynurenine, tryptophan-2,3-dioxygenase, oxidative stress, depression, cognitive impairment.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas acerca da disfunção cerebral associada a sepse, tendo em vista as dificuldades em estabelecer um tratamento eficaz. Por isso este trabalho buscou avaliar o envolvimento da via da quinurenina em alterações cerebrais na sepse através da inibição TDO que é umas das enzimas de ativação da via da quinurenina.

Com isso o presente estudo é o primeiro até o momento a avaliar o tratamento com inibidor de TDO em alterações cerebrais agudas e de longo prazo na sepse. Os achados obtidos neste estudo permitem concluir que a inibição de TDO reduziu a inflamação e o dano oxidativo, diminuiu a infiltração de neutrófilos e restaurou o metabolismo energético após a sepse, além disso também reduziu as alterações comportamentais nos sobreviventes da sepse.

Por fim, espera-se que os achados obtidos neste estudo auxiliem a compreensão da disfunção cerebral na sepse e que esses dados possam ser uteis para a replicação de estudos em modelos pré-clínicos e estudos translacionais.

REFERÊNCIAS

1. Taeb AM, Hooper MH, Marik PE. Sepsis: Current Definition, Pathophysiology, Diagnosis, and Management. Nutr Clin Pract. 2017 Jun 17;32(3):296–308.

2. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet. 2020 Jan 18;395(10219):200–11.

3. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016 Feb 23;315(8):801.

4. Kochanek KD, Xu J, Murphy SL, Miniño AM, Kung H-C. Deaths: preliminary data for 2009. Natl Vital Stat Rep. 2011 Mar;59(4):1–51.

5. Machado FR, Cavalcanti AB, Bozza FA, Ferreira EM, Angotti Carrara FS, Sousa JL, et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. Lancet Infect Dis. 2017 Nov 1;17(11):1180–9.

6. Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. N Engl J Med. 2017 Aug 3;377(5):414–7.

7. Zhang Z, Chen K. Vasoactive agents for the treatment of sepsis. Ann Transl Med. 2016;4(17):333–333.

8. Annane D, Sharshar T. Cognitive decline after sepsis. Lancet Respir Med. 2015 Jan 1;3(1):61–9.

9. Barichello T, Sayana P, Giridharan V V., Arumanayagam AS, Narendran B, Della Giustina A, et al. Long-Term Cognitive Outcomes After Sepsis: a Translational Systematic Review. Mol Neurobiol. 2019 Jan 23;56(1):186–251.

10. Calsavara AJC, Nobre V, Barichello T, Teixeira AL. Post-sepsis cognitive impairment and associated risk factors: A systematic review. Aust Crit Care. 2018 Jul 20;31(4):242–53.

11. Heming N, Mazeraud A, Verdonk F, Bozza FA, Chrétien F, Sharshar T. Neuroanatomy of sepsis-associated encephalopathy. Crit Care. 2017 Mar 21;21(1):65.

12. Biff D, Petronilho F, Constantino L, Vuolo F, Zamora-Berridi GJ, Dall'Igna DM, et al. Correlation of Acute Phase Inflammatory and Oxidative Markers With Long-term Cognitive Impairment in Sepsis Survivors Rats. Shock. 2013 Jul;40(1):45–8.

13. Uttara B, Singh A V, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. Curr Neuropharmacol. 2009 Mar;7(1):65–74.

14. Liu Z, Zhou T, Ziegler AC, Dimitrion P, Zuo L. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. Oxid Med Cell Longev. 2017 Jul 12;2017:1–11.

15. Wang Q, Liu D, Song P, Zou M-H. Tryptophan-kynurenine pathway is dysregulated in inflammation, and immune activation. Front Biosci (Landmark Ed. 2015 Jun 1;20:1116–43.

16. Gao R, Kan M, Wang S, Yang R, Zhang S. Disrupted Tryptophan Metabolism Induced Cognitive Impairment in a Mouse Model of Sepsis-associated Encephalopathy. Inflammation. 2016 Apr 27;39(2):550–60.

17. Ian Davis AL. What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapy? Ian. Expert Rev Neurother. 2015;2(2):147–85.

18. Campbell BM, Charych E, Lee AW, Möller T. Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. Front Neurosci. 2014;8:12.

19. Jung ID, Lee M-G, Chang JH, Lee JS, Jeong Y-I, Lee C-M, et al. Blockade of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Protects Mice against Lipopolysaccharide-Induced Endotoxin Shock. J Immunol. 2009;182(5):3146–54.

20. Danielski LG, Giustina A Della, Goldim MP, Florentino D, Mathias K, Garbossa L, et al. Vitamin B6 Reduces Neurochemical and Long-Term Cognitive Alterations After Polymicrobial Sepsis: Involvement of the Kynurenine Pathway Modulation. Mol Neurobiol. 2018 Jun 6;55(6):5255–68.

21. Zhang S, Qi F, Fang X, Yang D, Hu H, Huang Q, et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase inhibitory activities of tryptanthrin derivatives. Eur J Med Chem. 2018 Dec 5;160:133–45.

22. Lanz T V., Williams SK, Stojic A, Iwantscheff S, Sonner JK, Grabitz C, et al. Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) deficiency is associated with subclinical neuroprotection in a mouse model of multiple sclerosis. Sci Reports 2017 71. 2017 Jan 24;7(1):1–13.

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

24. Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. Lancet. 2018 Jul 7;392(10141):75–87.

25. Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. Crit Care Med. 1998 Nov;26(11):1793–800.

26. Font MD, Thyagarajan B, Khanna AK. Sepsis and Septic Shock – Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. Med Clin North Am. 2020 Jul 1;104(4):573–85.

27. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. Crit Care Med. 2013 Feb 1;41(2):580–637.

28. World Health Organization. Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis [Internet]. WHO. World Health Organization; 2018 [cited 2019 Sep 25]. Available from: https://www.who.int/servicedeliverysafety/areas/sepsis/en/

29. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, et al. The Surviving Sepsis Campaign: Results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis*. Crit Care Med. 2010 Feb;38(2):367–74.

30. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med. 2001 Jul;29(7):1303–10.

31. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. Virulence. 2014 Jan 1;5(1):4–11.

32. Lobo SM, Rezende E, Mendes CL, Oliveira MC de. Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: the Brazilian ICUs project. Rev Bras Ter Intensiva. 2019;31(1):1.

33. Instituto Latino Americano de Sepse. Protocolos gerenciados de sepse: Sepse grave e choque séptico 2005-2015 [Internet]. 2015 [cited 2019 Sep 25]. Available from: https://www.ilas.org.br/assets/arquivos/relatorio-nacional/relatorio-nacional.pdf

34. Cuthbertson BH, Elders A, Hall S, Taylor J, MacLennan G, Mackirdy F, et al. Mortality and quality of life in the five years after severe sepsis. Crit Care. 2013 Apr 16;17(2):R70.

35. Calsavara AJ, Costa PA, Nobre V, Teixeira AL. Prevalence and risk factors for post-traumatic stress, anxiety, and depression in sepsis survivors after ICU discharge. Brazilian J Psychiatry. 2021 May 1;43(3):269.

36. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term Cognitive Impairment and Functional Disability Among Survivors of Severe Sepsis. JAMA. 2010 Oct 27;304(16):1787.

37. Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. N Engl J Med. 2013 Aug 29;369(9):840–51.

38. Fujishima S. Organ dysfunction as a new standard for defining sepsis. Inflamm Regen. 2016 Dec 15;36(1):24.

39. Caraballo C, Ascuntar J, Hincapié C, Restrepo C, Bernal E, Jaimes F. Association between site of infection and in-hospital mortality in patients with sepsis admitted to emergency departments of tertiary hospitals in Medellin, Colombia. Rev Bras Ter Intensiva. 2019;31(1):47–56.

40. Nduka OO, Parrillo JE. The Pathophysiology of Septic Shock. Crit Care Clin.

2016;25(4):677–702.

41. D'Elia R V., Harrison K, Oyston PC, Lukaszewski RA, Clark GC. Targeting the "Cytokine Storm" for Therapeutic Benefit. Clin Vaccine Immunol. 2013 Mar;20(3):319–27.

42. Lilic D. Immune response to infection. Anaesth Intensive Care Med. 2009 May 1;10(5):218–20.

43. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. Trends Immunol. 2002 Jun;23(6):301–4.

44. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nat Rev Immunol. 2010 Dec 19;10(12):826–37.

45. Liaunardy-Jopeace A, Gay NJ. Molecular and Cellular Regulation of Toll-Like Receptor-4 Activity Induced by Lipopolysaccharide Ligands. Front Immunol. 2014 Oct 6;5:473.

46. Raymond SL, Holden DC, Mira JC, Stortz JA, Loftus TJ, Mohr AM, et al. Microbial recognition and danger signals in sepsis and trauma. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. 2017 Oct 1;1863(10):2564–73.

47. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nat Rev Immunol. 2010 Dec 19;10(12):826–37.

48. Huang M, Cai S, Su J. The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. Int J Mol Sci. 2019 Nov 1;20(21).

49. Iking-Konert C, Bartz-Bazzanella P, Falagan D, Hofman MW, Schwarting A, Dörner T. Interleukin-6-Blockade als potenzielles therapeutisches Target bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen. Z Rheumatol. 2014 Apr 30;73(3):269–76.

50. Shen X, Cao K, Jiang J, Guan W, Du J. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. J Cell Mol Med. 2017 Sep 1;21(9):1687–97.

51. Armstrong BA, Betzold RD, May AK. Sepsis and Septic Shock Strategies. Surg Clin North Am. 2017;97(6):1339–79.

52. Brown G, Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. Cardiovasc Res. 2007 Jul 15;75(2):283–90.

53. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. Virulence. 2014 Jan;5(1):66–72.

54. Kozlov A V., Lancaster JR, Meszaros AT, Weidinger A. Mitochondria-meditated pathways of organ failure upon inflammation. Redox Biol. 2017 Oct 1;13:170–81.

55. Kelso GF, Porteous CM, Hughes G, Ledgerwood EC, Gane AM, Smith RAJ, et al. Prevention of mitochondrial oxidative damage using targeted antioxidants. Ann N Y Acad Sci. 2002 Apr;959:263–74.

56. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002 Jan 1;82(1):47–95.

57. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J. 2009 Jan 1;417(1):1–13.

58. Jara C, Torres AK, Olesen MA, Tapia-Rojas C. Mitochondrial Dysfunction as a Key Event during Aging: From Synaptic Failure to Memory Loss. Mitochondria Brain Disord. 2019 Aug 7;

59. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. J Neurochem. 2002 Mar 1;80(5):780–7.

60. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007 Jan;39(1):44–84.

61. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. Crit Care Med. 1999 Jul;27(7):1230–51.

62. Cecchini G. Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain. Annu Rev Biochem. 2003 Jun;72(1):77–109.

63. Jodeiri Farshbaf M, Kiani-Esfahani A. Succinate dehydrogenase: Prospect for neurodegenerative diseases. Mitochondrion. 2018 Sep 1;42:77–83.

64. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants : When to Use the Synthetic Antioxidants. Oxid Med Cell Longev. 2013 Apr 29;2013:1–11.

65. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal. 2011 Oct 1;15(7):1957–97.

66. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. Am J Physiol Cell Physiol. 2008 Oct;295(4):C849-68.

67. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010 Jul;4(8):118–26.

68. Ye Z-W, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. Biochim Biophys Acta. 2015 Aug;1850(8):1607–21.

69. Hauck AK, Bernlohr DA. Oxidative stress and lipotoxicity. J Lipid Res. 2016 Jan 1;57(11):1976–86.

70. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. Antioxid Redox Signal. 2015;23(14):1144–70.

71. Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. Neurology. 1995 Aug;45(8):1594–601.

72. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab Invest. 1982 Nov;47(5):412–26.

73. Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T, Uchida K, Nikaido O, Osawa T, et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. J Invest Dermatol. 1996 Nov;107(5):733–7.

74. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:1–44.

75. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. Physiol Rev. 2007 Jan;87(1):315–424.

76. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. Trends Pharmacol Sci. 2017 Jul 1;38(7):592–607.

77. Lehoux S. Redox signalling in vascular responses to shear and stretch. Cardiovasc Res. 2006 Jul 15;71(2):269–79.

78. Schneider CD, de Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. Rev Bras Med do Esporte. 2004;10(4):308–18.

79. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic Biol Med. 2002 Aug 1;33(3):337–49.

80. Prakash PA, Yogeswaran U, Chen S-M. A review on direct electrochemistry of catalase for electrochemical sensors. Sensors. 2009 Mar 13;9(3):1821–44.

81. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. Oxid Med Cell Longev. 2012;2012:1–11.

82. Angelova PR, Abramov AY. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. FEBS Lett. 2018 Mar 1;592(5):692–702.

83. Osterbur K, Mann FA, Kuroki K, DeClue A. Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Humans and Animals. J Vet Intern Med. 2014 Jul;28(4):1141–51.

84. Vincent J-L, Korkut HA. Defining Sepsis. Clin Chest Med. 2008 Dec;29(4):585–90.

85. Prescott HC, Angus DC. Enhancing recovery from sepsis: A review. JAMA - J Am Med Assoc. 2018;319(1):62–75.

86. Iwashyna TJ, Cooke CR, Wunsch H, Kahn JM. Population Burden of Long-

Term Survivorship After Severe Sepsis in Older Americans. J Am Geriatr Soc. 2012 Jun;60(6):1070–7.

87. Sonneville R, Verdonk F, Rauturier C, Klein IF, Wolff M, Annane D, et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. Ann Intensive Care. 2013;3(1):15.

88. 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. 2015 Jan 1;43:54–9.

89. Barichello T, Generoso JS, Simões LR, Goularte JA, Petronilho F, Saigal P, et al. Role of Microglial Activation in the Pathophysiology of Bacterial Meningitis. Mol Neurobiol. 2016 Apr 7;53(3):1770–81.

90. Danielski LG, Giustina A Della, Badawy M, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F, et al. Brain Barrier Breakdown as a Cause and Consequence of Neuroinflammation in Sepsis. Mol Neurobiol. 2018;55(2):1045–53.

91. Mazeraud A, Pascal Q, Verdonk F, Heming N, Chrétien F, Sharshar T. Neuroanatomy and Physiology of Brain Dysfunction in Sepsis. Clin Chest Med. 2016 Jun 1;37(2):333–45.

92. Anand KS, Dhikav V. Hippocampus in health and disease: An overview. Ann Indian Acad Neurol. 2012 Oct;15(4):239–46.

93. Nikonenko AG, Radenovic L, Andjus PR, Skibo GG. Structural Features of Ischemic Damage in the Hippocampus. Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol. 2009 Dec;292(12):1914–21.

94. Annane D. Hippocampus: a future target for sepsis treatment! Intensive Care Med. 2009 Apr 21;35(4):585–6.

95. Muscatell KA, Dedovic K, Slavich GM, Jarcho MR, Breen EC, Bower JE, et al. Greater amygdala activity and dorsomedial prefrontal–amygdala coupling are associated with enhanced inflammatory responses to stress. Brain Behav Immun. 2015 Jan;43:46–53.

96. Jones C, Griffiths RD. Mental and physical disability after sepsis. Minerva Anestesiol. 2013 Nov;79(11):1306–12.

97. Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LC, Petronilho F, Constantino LS, Stertz L, et al. Depressive-Like Parameters in Sepsis Survivor Rats. Neurotox Res. 2010 Apr 25;17(3):279–86.

98. Flierl MA, Rittirsch D, Weckbach S, Huber-Lang M, Ipaktchi K, Ward PA, et al. Disturbances of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and plasma electrolytes during experimental sepsis. Ann Intensive Care. 2011 Dec;1(1):53.

99. Hill AR, Spencer-Segal JL. Glucocorticoids and the Brain after Critical Illness. Endocrinology. 2021 Mar 1;162(3).

100. Stubbs DJ, Yamamoto AK, Menon DK. Imaging in sepsis-associated

encephalopathy—insights and opportunities. Nat Rev Neurol. 2013 Oct 3;9(10):551–61.

101. Jacob A, Brorson JR, Alexander JJ. Septic encephalopathy: Inflammation in man and mouse. Neurochem Int. 2011 Mar 1;58(4):472–6.

102. Chen Y, Guillemin GJ. Kynurenine pathway metabolites in humans: Disease and healthy states. Int J Tryptophan Res. 2009;2(1):1–19.

103. Qin Y, Wang N, Zhang X, Han X, Zhai X, Lu Y. IDO and TDO as a potential therapeutic target in different types of depression. Metab Brain Dis. 2018 Dec 16;33(6):1787–800.

104. de Bie J, Lim CK, Guillemin GJ. Kynurenines, Gender and Neuroinflammation; Showcase Schizophrenia. Neurotox Res. 2016;30(3):285–94.

105. Guillemin GJ, Smith DG, Smythe GA, Armati PJ, Brew GJ. Expression of The kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages. Adv Exp Med Biol. 2003;527:105–12.

106. Maddison DC, Giorgini F. The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. Semin Cell Dev Biol. 2015 Apr 1;40:134–41.

107. Amaral M, Levy C, Heyes DJ, Lafite P, Outeiro TF, Giorgini F, et al. Structural basis of kynurenine 3-monooxygenase inhibition. Nature. 2013;496(7445):382–5.

108. Wonodi I, McMahon RP, Krishna N, Mitchell BD, Liu J, Glassman M, et al. Influence of kynurenine 3-monooxygenase (KMO) gene polymorphism on cognitive function in schizophrenia. Schizophr Res. 2014 Dec 1;160(1–3):80–7.

109. Holtze M, Saetre P, Engberg G, Schwieler L, Werge T, Andreassen OA, et al. Kynurenine 3-monooxygenase polymorphisms: relevance for kynurenic acid synthesis in patients with schizophrenia and healthy controls. J Psychiatry Neurosci. 2012 Jan 1;37(1):53–7.

110. Schwarcz R, Stone TW. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. Neuropharmacology. 2017 Jan;112(Pt B):237–47.

111. Mithaiwala MN, Santana-Coelho D, Porter GA, O'Connor JC. Neuroinflammation and the Kynurenine Pathway in CNS Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. Cells. 2021 Jun 1;10(6):1548.

112. Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 3-Hydroxykynurenine, an Endogenous Oxidative Stress Generator, Causes Neuronal Cell Death with Apoptotic Features and Region Selectivity. J Neurochem. 2002 Nov 14;70(1):299–307.

113. Fukuda K. Etiological classification of depression based on the enzymes of tryptophan metabolism. BMC Psychiatry. 2014 Dec 24;14(1):372.

114. Van der Vliet A, Bast A. Effect of oxidative stress on receptors and signal transmission. Chem Biol Interact. 1992 Dec;85(2–3):95–116.

115. López AS, Alegre E, Díaz-Lagares Á, García-Girón C, Coma MJ, González Á. Effect of 3-hydroxyanthranilic acid in the immunosuppressive molecules indoleamine dioxygenase and HLA-G in macrophages. Immunol Lett. 2008 Apr 15;117(1):91–5.

116. Goldstein LE, Leopold MC, Huang X, Atwood CS, Saunders AJ, Hartshorn M, et al. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction. Biochemistry. 2000 Jun 20;39(24):7266–75.

117. Modoux M, Rolhion N, Mani S, Sokol H. Tryptophan Metabolism as a Pharmacological Target. Trends Pharmacol Sci. 2021 Jan 1;42(1):60–73.

118. Grant RS, Coggan SE, Smythe GA. The Physiological Action of Picolinic Acid in the Human Brain. Int J Tryptophan Res. 2009;2(1):71.

119. Cioczek-Czuczwar A, Czuczwar P, Turski WA, Parada-Turska J. Influence of picolinic acid on seizure susceptibility in mice. Pharmacol Reports. 2017 Feb 1;69(1):77–80.

120. Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M, et al. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. Brain. 1992 Oct;115 (Pt 5):1249–73.

121. Lugo-Huitrón R, Ugalde Muñiz P, Pineda B, Pedraza-Chaverrí J, Ríos C, Pérez-de la Cruz V. Quinolinic Acid: An Endogenous Neurotoxin with Multiple Targets. Oxid Med Cell Longev. 2013;2013:1–14.

122. Lee J-M, Tan V, Lovejoy D, Braidy N, Rowe DB, Brew BJ, et al. Involvement of quinolinic acid in the neuropathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. Neuropharmacology. 2017 Jan;112(Pt B):346–64.

123. Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu QU. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. Nat Rev Neurosci. 2012 Jul;13(7):465–77.

124. Mor A, Tankiewicz-Kwedlo A, Krupa A, Pawlak D. Role of Kynurenine Pathway in Oxidative Stress during Neurodegenerative Disorders. Cells. 2021 Jun 26;10(7):1603.

125. Walker AK, Wing EE, Banks WA, Dantzer R. Leucine competes with kynurenine for blood-to-brain transport and prevents lipopolysaccharide-induced depression-like behavior in mice. Mol Psychiatry. 2019 Oct 9;24(10):1523–32.

126. Nigam SK, Bush KT, Martovetsky G, Ahn S-Y, Liu HC, Richard E, et al. The Organic Anion Transporter (OAT) Family: A Systems Biology Perspective. Physiol Rev. 2015 Jan 1;95(1):83–123.

127. Tattevin P, Monnier D, Tribut O, Dulong J, N B, F M, et al. Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock. J Infect Dis. 2010;201(6):956–66.

128. Tattevin P, Monnier D, Tribut O, Dulong J, Bescher N, Mourcin F, et al.

Enhanced Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock. J Infect Dis. 2010 Mar 15;201(6):956–66.

129. Rogers AJ, McGeachie M, Baron RM, Gazourian L, Haspel JA, Nakahira K, et al. Metabolomic Derangements Are Associated with Mortality in Critically Ill Adult Patients. Parikh SM, editor. PLoS One. 2014 Jan 30;9(1):e87538.

130. Padberg J-S, Van Meurs M, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM, Zijlstra JG, et al. Indoleamine-2,3-dioxygenase activity in experimental human endotoxemia. Exp Transl Stroke Med. 2012 Dec 5;4(1):24.

131. Huttunen R, Syrjänen J, Aittoniemi J, Oja SS, Raitala A, Laine J, et al. High activity of indoleamine 2,3 dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. Shock. 2010 Feb;33(2):149–54.

132. Hoshi M, Osawa Y, Ito H, Ohtaki H, Ando T, Takamatsu M, et al. Blockade of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Reduces Mortality from Peritonitis and Sepsis in Mice by Regulating Functions of CD11b + Peritoneal Cells. McCormick BA, editor. Infect Immun. 2014 Nov;82(11):4487–95.

133. Bender DA, Njagi EN, Danielian PS. Tryptophan metabolism in vitamin B6-deficient mice. Br J Nutr. 1990 Jan;63(1):27–36.

134. Yu C-P, Pan Z-Z, Luo D-Y. TDO as a therapeutic target in brain diseases. Metab Brain Dis. 2016 Aug 13;31(4):737–47.

135. Nakamura T, Niimi S, Nawa K, Noda C, Ichihara A, Takagi Y, et al. Multihormonal regulation of transcription of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene in primary cultures of adult rat hepatocytes with special reference to the presence of a transcriptional protein mediating the action of glucocorticoids. J Biol Chem. 1987 Jan 15;262(2):727–33.

136. Schutz G, Killewich L, Chen G, Feigelson P. Control of the mRNA for hepatic tryptophan oxygenase during hormonal and substrate induction. Proc Natl Acad Sci. 1975 Mar 1;72(3):1017–20.

137. Too LK, Li KM, Suarna C, Maghzal GJ, Stocker R, McGregor IS, et al. Deletion of TDO2, IDO-1 and IDO-2 differentially affects mouse behavior and cognitive function. Behav Brain Res. 2016 Oct 1;312:102–17.

138. Liao M, Pabarcus MK, Wang Y, Hefner C, Maltby DA, Medzihradszky KF, et al. Impaired Dexamethasone-Mediated Induction of Tryptophan 2,3-Dioxygenase in Heme-Deficient Rat Hepatocytes: Translational Control by a Hepatic eIF2α Kinase, the Heme-Regulated Inhibitor. J Pharmacol Exp Ther. 2007 Dec 1;323(3):979–89.

139. Kozlova A, Frédérick R. Current state on tryptophan 2,3-dioxygenase inhibitors: a patent review. https://doi.org/101080/1354377620191556638. 2019 Jan 2;29(1):11–23.

140. Dolšak A, Gobec S, Sova M. Indoleamine and tryptophan 2,3-dioxygenases as important future therapeutic targets. Pharmacol Ther. 2021 May 1;221:107746.

141. Kanai M, Funakoshi H, Takahashi H, Hayakawa T, Mizuno S, Matsumoto K, et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. Mol Brain. 2009 Dec 27;2(1):8.

142. Sorgdrager F, Ley C van Der, Faassen M van, Calus E, Nollen E, Kema I, et al. The Effect of Tryptophan 2,3-Dioxygenase Inhibition on Kynurenine Metabolism and Cognitive Function in the APP23 Mouse Model of Alzheimer's Disease. Int J Tryptophan Res. 2020;13.

143. Menke A. Is the HPA Axis as Target for Depression Outdated, or Is There a New Hope? Front Psychiatry. 2019 Feb 28;10(FEB):101.

144. Badawy AA-B. Tryptophan: The key to boosting brain serotonin synthesis in depressive illness. J Psychopharmacol. 2013 Oct 31;27(10):878–93.

145. Maes M. Evidence for an immune response in major depression: A review and hypothesis. Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry. 1995 Jan;19(1):11–38.

146. Salter M, Pogson CI. The role of tryptophan 2,3-dioxygenase in the hormonal control of tryptophan metabolism in isolated rat liver cells. Effects of glucocorticoids and experimental diabetes. Biochem J. 1985 Jul 15;229(2):499–504.

147. Badawy A-B. Plasma free tryptophan revisited: what you need to know and do before measuring it. J Psychopharmacol. 2010 Jun 12;24(6):809–15.

148. Miyauchi T. Long-Term Improvement of Aggression in a Patient With Schizophrenia Using Allopurinol as an Adjuvant: A Case Report. J Clin Psychopharmacol. 2021 Mar 1;41(2):212–4.

149. Elion GB, Callahan S, Nathan H, Bieber S, Rundles RW, Hitchings GH. Potentiation by inhibition of drug degradation : 6-substituted purines and xanthine oxidase. Biochem Pharmacol. 1963 Jan 1;12(1):85–93.

150. Edwards NL, So A. Emerging Therapies for Gout. Rheum Dis Clin North Am. 2014 May 1;40(2):375–87.

151. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 135401907, Allopurinol [Internet]. PubChem. 2021 [cited 2021 Nov 7]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Allopurinol

152. Day RO, Graham GG, Hicks M, McLachlan AJ, Stocker SL, Williams KM. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Allopurinol and Oxypurinol. Clin Pharmacokinet 2007 468. 2012 Sep 30;46(8):623–44.

153. Pea F. Pharmacology of Drugs for Hyperuricemia. Hyperuricemic Syndr Pathophysiol Ther. 2005 Dec 9;147:35–46.

154. Schlesinger N, Brunetti L. Beyond urate lowering: Analgesic and anti-inflammatory properties of allopurinol. Semin Arthritis Rheum. 2020 Jun 1;50(3):444–50.

155. Shatney CH, Toledo-Pereyra LH, Lillehei RC. Experiences with allopurinal in

canine endotoxin shock. Adv Shock Res. 1980;4:119–37.

156. Xiang L, Klintman D, Thorlacius H. Allopurinol inhibits CXC chemokine expression and leukocyte adhesion in endotoxemic liver injury. Inflamm Res. 2003 Aug 1;52(9):353–8.

157. Gibney SM, Fagan EM, Waldron AM, O'Byrne J, Connor TJ, Harkin A. Inhibition of stress-induced hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase exhibits antidepressant activity in an animal model of depressive behaviour. Int J Neuropsychopharmacol. 2014;17(6):917–28.

158. Baloğlu M, Gökalp Özkorkmaz E. Neuroprotective effects of allopurinol on spinal cord injury in rats: A biochemical and immunohistochemical study. Folia Morphol. 2019;78(4):676–83.

159. Namazi MR. Cetirizine and allopurinol as novel weapons against cellular autoimmune disorders. Int Immunopharmacol. 2004 Mar 1;4(3):349–53.

160. Welch AN, Badawy AAB. Tryptophan pyrrolase in haem regulation. Experiments with administered haematin and the relationship between the haem saturation of tryptophan pyrrolase and the activity of 5-aminolaevulinate synthase in rat liver. Biochem J. 1980 Nov 15;192(2):403–10.

161. Réus GZ, Becker IRT, Scaini G, Petronilho F, Oses JP, Kaddurah-Daouk R, et al. The inhibition of the kynurenine pathway prevents behavioral disturbances and oxidative stress in the brain of adult rats subjected to an animal model of schizophrenia. Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry. 2018 Feb;81:55–63.

162. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? Trends Microbiol. 2011;19(4):198–208.

163. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal Models of sepsis: setting the stage. Nat Rev Drug Discov. 2005 Oct;4(10):854–65.

164. De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. Agents Actions. 1989 Mar;26(3):335–41.

165. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 1982;126(1):131–8.

166. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1990;186:421–31.

167. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 1990;186:464–78.

168. Bannister J V, Calabrese L. Assays for Superoxide Dismutase. Glick D, editor. Methods Biochem Analusis. 1987 Feb;32:279–312.

169. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzym. 1984;(105):121–6.

170. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. Clin Chim Acta. 1985 Nov;153(1):23–36.

171. Cassina A, Radi R. Differential Inhibitory Action of Nitric Oxide and Peroxynitrite on Mitochondrial Electron Transport. Arch Biochem Biophys. 1996 Apr 15;328(2):309–16.

172. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clin Chim Acta. 1994;228(1):35–51.

173. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265–75.

174. Carvalho D, Petronilho F, Vuolo F, Machado RA, Constantino L, Guerrini R, et al. The nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. Intensive Care Med. 2008 Dec 10;34(12):2284–90.

175. De Lima MNM, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schröder N. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with L-deprenyl. Exp Gerontol. 2005;40(6):506–11.

176. Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, et al. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. Intensive Care Med. 2008;34(9):1724–31.

177. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. Eur J Pharmacol. 1978 Feb 15;47(4):379–91.

178. Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. Trends Pharmacol Sci. 2002 May 1;23(5):238–45.

ANEXO A - Parecer de aprovação do CEUA

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais — UNISUL

Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 12 de dezembro de 2018
Registro na CEUA (código): 18.035.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Fabricia Cardoso Petronilho

Prezado(a),

Viemos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Estudo da inibição de diferentes rotas da via da quinurenina sobre a disfunção cerebral na sepse", registrada com o 18.035.4.01.IV, sob a responsabilidade de Fabricia Cardoso Petronilho - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 12 de dezembro de 2018.

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

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

Atenciosamente,

Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão

UNISUL - *Campus* Grande Florianópolis,
Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária, CEP 88137-270, Palhoça, SC.
Fone: (48) 3279-1036 / E-mail: ceua@unisul.br

ANEXO B – Produção científica

Materials Science & Engineering C 92 (2018) 228–235

Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science & Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msec

Vasorelaxant effect of standardized extract of *Cecropia glaziovii* Snethl encapsulated in PLGA microparticles: *In vitro* activity, formulation development and release studies

Talitha Caldas dos Santos[a], Mariana Alves Battisti[a], Kiuanne Lino Lobo[b], Thiago Caon[a], Aurea Elizabeth Linder[b], Diva Sonaglio[a], Angela Machado de Campos[a,*]

[a] Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis 88040-900, Brazil

[b] Laboratório de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis 88040-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Cecropia glaziovii Snethl
Microparticles
Response surface design
Vasorelaxant activity
Release studies
Osmotic effect

ABSTRACT

In this study, the standardized dry extract of *C. glaziovii* (SDE) provided a significant vasorelaxant effect after contractions induced by phenylephrine in rat aortic rings in an endothelium-dependent manner, confirming that endothelial factors are needed to stimulate this response. A vasorelaxation close to that of acetylcholine was achieved, justifying the development of new formulations for this plant material. In this context, microparticles were selected to encapsulate SDE and the double emulsion technique was considered because of the hydrophilic nature of plant material. Two experimental designs were applied. Firstly, the effect of formulation parameters on particle size, size distribution and encapsulation efficiency (EE) was evaluated. As low EE was achieved, the effect of the osmotic pressure of the external phase was evaluated in a second experimental design. The presence of the osmotic agent (NaCl) impacted positively on the EE and slower *in vitro* release profile was obtained, which is desired in controlled release systems. The formation of denser and less porous particle surface, which was identified by SEM analysis, contributes to explain these findings. Microstructures showed to be a promising delivery system for the *C. glaziovii* SDE considering that a sustained release was achieved.

1. Introduction

In folk medicine, the leaves of *Cecropia glaziovii* Snethl are used in the treatment of various diseases, including the control of blood pressure [1]. Some literature studies have reported a hypotensive effect for plant preparations [2, 3], which has been attributed to a synergism between *C*-glycosylflavonoids and proanthocyanidins as these compounds showed to be inactive when tested separately [4]. Preliminary phytochemical studies have reported the presence of catechins, procyanidins and flavonoids in standardized aqueous extracts of *C. glaziovii* [5]. Costa et al. [6], in turn, isolated the main *C*-glycosyl flavonoids in aqueous extracts from the *C. glaziovii* leaves, which were chlorogenic acid, isoorientin, orientin, isovitexin and isoquercitrin.

In preliminary pharmacological studies performed by our research team, aqueous and hydroethanolic crude extracts were prepared by decoction and maceration using 5% (w/v) of *C. glaziovii* dried leaves. The hydroethanolic extract obtained by maceration (20% v/v ethanol) demonstrated a more significant vasodilator activity [7]. The effect of temperature and the presence of preservative on the stability of chemical markers [chlorogenic acid (CGA) and caffeic acid (CFA)] during the extraction process were also evaluated. High concentrations of CGA and CFA were achieved depending on extraction conditions [8]. In this context, *C. glaziovii* crude hydroethanolic extracts were prioritized due to greater vasorelaxant effect and a standardized dry extract (SDE) with a maximum content of both markers CGA and CFA was optimized [9].

Once hydrolysis phenomena were identified in previous stability studies for chemical markers from this plant [8], microparticles were selected in order to overcome this problem. Microparticles have been characterized by providing a higher drug release control compared to nanoparticles [10], which would contribute to extending the pharmacological activity. Moreover, the denser polymer layer in microparticles reduces the water access into the particle [11], contributing to reduce degradative hydrolysis reactions of encapsulated material. In past two decades, poly lactic-*co*-glycolic acid (PLGA) has been among the most attractive polymeric candidates used to fabricate devices for drug delivery particularly due to its high biocompatibility and biodegradability

* Corresponding author at: Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil.
E-mail address: angela.campos@ufsc.br (A.M. de Campos).

https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.06.046
Received 24 October 2017; Received in revised form 23 May 2018; Accepted 19 June 2018
Available online 21 June 2018
0928-4931/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Anais da Academia Brasileira de Ciências (2019) 91(4): e20190434
(Annals of the Brazilian Academy of Sciences)
Printed version ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690
http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201920190434
www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

Vitamin B6 reduces oxidative stress in lungs and liver in experimental sepsis

AMANDA D. GIUSTINA, LUCINÉIA G. DANIELSKI, MICHELE M. NOVOCHADLO, MARIANA P.S. GOLDIM, LARISSA JOAQUIM, KIUANNE L.L. METZKER, RAQUEL JACONI DE CARLI, TAIS DENICOL, THAINA CIDREIRA, THAYNAN VIEIRA and FABRICIA PETRONILHO

Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, 88704-900 Tubarão, SC, Brazil

Manuscript received on April 24, 2019; accepted for publication on August 2, 2019

How to cite: GIUSTINA AD, DANIELSKI LG, NOVOCHADLO MM, GOLDIM MPS, JOAQUIM L, METZKER KLL, CARLI RJ, DENICOL T, CIDREIRA T, VIEIRA T AND PETRONILHO F. 2019. Vitamin B6 reduces oxidative stress in lungs and liver in experimental sepsis. An Acad Bras Cienc 91: e20190434. DOI 10.1590/0001-3765201920190434.

Abstract: Sepsis is a life-threatening organ dysfunction induced by a disrupted host response to infecting pathogens. Inflammation and oxidative stress are intrinsically related to sepsis progression and organ failure. Vitamin B6 is an important cellular cofactor for metabolic processes and has anti-inflammatory and antioxidant properties. We aimed at evaluating the effect of vit B6 on inflammation and oxidative stress markers in the liver and lung of rats subjected to a relevant animal model of polymicrobial sepsis. Adult male *Wistar* rats were submitted to cecal ligation and perforation model and immediately after sepsis induction, vit B6 was administered as a single dose (600 mg/kg, subcutaneous). Twenty-four hours later, the lung and liver were harvest for neutrophil infiltration, oxidative markers to lipids and protein and antioxidant activity of endogenous enzyme. Vitamin B6 diminished neutrophil infiltration in both organs, oxidative markers in the liver and restored catalase activity levels in the lung of septic animals. Vitamin B6 exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in peripheral organs after polymicrobial sepsis.

Key words: sepsis, vitamin B6, oxidative stress, antioxidant.

INTRODUCTION

Sepsis is a life-threatening organ dysfunction induced by a dysregulated host response to infectious stimuli (Singer et al. 2016). The pathologic hallmark of sepsis relies on the failure to maintain a satisfactory balance between excessive and inadequate inflammatory response, leading to a massive generation of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS) (Andrades et al. 2009). Reactive species promote several proinflammatory effects, such as neutrophil recruitment (Hotchkiss and Karl 2003), and favor the occurrence of oxidative damage due to an imbalanced activity of endogenous enzymes, including catalase (CAT) (Andrades et al. 2005). As oxidative stress plays an important role in the development of sepsis-induced organ dysfunction, the application of antioxidant compounds has been considered a potential and promisor treatment (Ritter et al. 2004).

Vitamin B6 (vit B6) is a water-soluble vitamin easily found as pyridoxal, pyridoxine and pyridoxamine forms in animal and vegetal foods (Salam et al. 2015). After digestion and absorption,

Correspondence to: Fabricia Petronilho
E-mail: fabricia.petronilho@unisul.br
ORCid: https://orcid.org/0000-0003-3240-2808

Microvascular Research 123 (2019) 19–24

Contents lists available at ScienceDirect

Microvascular Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymvre

Oxidative stress in the choroid plexus contributes to blood–cerebrospinal fluid barrier disruption during sepsis development

Mariana Pereira Goldim[a], Lucineia Gainski Danielski[a], Judite Filgueiras Rodrigues[a], Larissa Joaquim[a], Leandro Garbossa[a], Aloir Neri de Oliveira Junior[a], Kiuanne Lino Lobo Metzker[a], Amanda Della Giustina[a], Taise Cardoso[a], Tatiana Barichello[b,c], Fabricia Petronilho[a,*]

[a] Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil
[b] Center for Experimental Models in Psychiatry, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The University of Texas Medical School at Houston, Houston, TX, USA
[c] Laboratory of Experimental Microbiology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Sepsis
Choroid plexus
Oxidative stress
Neuroinflammation

ABSTRACT

Background: The choroid plexus (CP), main component of blood–cerebrospinal fluid barrier (BCSFB), protects the brain from peripheral inflammation similar to the blood–brain barrier. Thus, CP is considered a critical target site of oxidative damage, which in sepsis oxidative stress is likely to be a major step in the development of brain damage. Functional alterations in CP may be associated with sepsis-induced brain injury. However, there is no description on the mechanisms associated with BCSFB disruption during sepsis development.
Materials and methods: To test this hypothesis, we examined time-dependent oxidative stress markers in CP and permeability of BCSFB in rats submitted to polymicrobial sepsis by cecal ligation and puncture (CLP) or sham surgery (control). We assessed albumin cerebrospinal fluid/plasma concentration quotient (Qalb), an index of BCSFB dysfunction and in CP samples, the oxidative damage in lipids, proteins, antioxidant enzymes and nitrite/nitrate (N/N) concentration in 12, 24 and 48 h after CLP.
Results: The increase of BCSFB permeability is time-related to the increase of N/N concentration, oxidative damage to lipid and proteins, and decrease of antioxidant enzyme superoxide dismutase activity at 12 h in the CP; and decrease of catalase activity in 12 and 24 h.
Conclusions: In experimental sepsis the BCSFB dysfunction occurs and oxidative stress seems to be a major step in this dysfunction.

1. Introduction

Sepsis associated encephalopathy (SAE) is characterized with delirium, coma, and seizure, being a cause of cognitive dysfunction, morbidity, and mortality in critical illness. Evidences showed that pro-inflammatory cytokines play an important role in its development and in the subsequent production of reactive oxygen species (ROS) that further aggravate this dysfunction (Balusu et al., 2016a). These mediators are involved with blood brain barrier (BBB) alterations, with subsequent increased permeability and cerebral edema, which recent studies shows that are an important step in development of SAE (Balusu et al., 2016b; Kaur et al., 2016). While most studies focus on the BBB and the development of SAE (Balusu et al., 2016a; Ericsson et al., 1995; Marques et al., 2007), few studies address the choroid plexus (CP) participation in inflammatory brain processes.

The CP is an epithelial cell monolayer located along the lateral, third, and fourth ventricles of the brain. CP forms an interface between peripheral blood and cerebrospinal fluid (CSF) and is the main component of the blood–CSF barrier (BCSFB) (Balusu et al., 2016b). Generally, CP is considered to be the route of migration of endogenous and exogenous compounds into and out of the brain in addition to the BBB (Kaur et al., 2016).

Several lines of evidence have implicated the role of CP as an important mediator of acute peripheral inflammation into the central nervous system (CNS) (Balusu et al., 2016a; Marques et al., 2007; Kaur et al., 2016). It has been demonstrated that the structure constitutively

* Corresponding author at: Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil.
E-mail address: fabricia.petronilho@unisul.br (F. Petronilho).

https://doi.org/10.1016/j.mvr.2018.12.001
Received 3 September 2018; Received in revised form 7 November 2018; Accepted 12 December 2018
Available online 13 December 2018
0026-2862/ © 2018 Published by Elsevier Inc.

Journal of Drug Targeting

ISSN: 1061-186X (Print) 1029-2330 (Online) Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/idrt20

Gold nanoparticles potentiates N-acetylcysteine effects on neurochemicals alterations in rats after polymicrobial sepsis

Fabricia Petronilho, Leonardo Tenfen, Amanda Della Giustina, Larissa Joaquim, Michele Novochadlo, Aloir Neri de Oliveira Junior, Erick Bagio, Mariana Pereira de Souza Goldim, Raquel Jaconi de Carli, Sandra Regina Santana de Aguiar Bonfante, Kiuanne Lino Lobo Metzker, Samara Muttini, Thayná Marinho dos Santos, Mariana Pacheco de Oliveira, Nicole Alessandra Engel, Gislaine Tezza Rezin, Luiz Alberto Kanis & Tatiana Barichello

To cite this article: Fabricia Petronilho, Leonardo Tenfen, Amanda Della Giustina, Larissa Joaquim, Michele Novochadlo, Aloir Neri de Oliveira Junior, Erick Bagio, Mariana Pereira de Souza Goldim, Raquel Jaconi de Carli, Sandra Regina Santana de Aguiar Bonfante, Kiuanne Lino Lobo Metzker, Samara Muttini, Thayná Marinho dos Santos, Mariana Pacheco de Oliveira, Nicole Alessandra Engel, Gislaine Tezza Rezin, Luiz Alberto Kanis & Tatiana Barichello (2019): Gold nanoparticles potentiates N-acetylcysteine effects on neurochemicals alterations in rats after polymicrobial sepsis, Journal of Drug Targeting, DOI: 10.1080/1061186X.2019.1678168

To link to this article: https://doi.org/10.1080/1061186X.2019.1678168

Accepted author version posted online: 09 Oct 2019.

Submit your article to this journal

View related articles

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=idrt20

Molecular Neurobiology (2020) 57:5247–5262
https://doi.org/10.1007/s12035-020-02089-9

NLRP3 Activation Contributes to Acute Brain Damage Leading to Memory Impairment in Sepsis-Surviving Rats

Lucineia Gainski Danielski[1] · Amanda Della Giustina[1] · Sandra Bonfante[1] · Mariana Pereira de Souza Goldim[1] · Larissa Joaquim[1] · Kiuanne Lobo Metzker[1] · Erica Bernardo Biehl[1] · Thaynan Vieira[1] · Fabiana Durante de Medeiros[1] · Naiana da Rosa[1] · Jaqueline Generoso[2] · Lutiana Simoes[2] · Hémelin Resende Farias[3] · Isabela da Silva Lemos[3] · Vijayasree Giridharan[4] · Gislaine Tezza Rezin[1] · Jucelia Jeremias Fortunato[1] · Rafael Mariano Bitencourt[1] · Emilio Luiz Streck[3] · Felipe Dal-Pizzol[2] · Tatiana Barichello[2,4] · Fabricia Petronilho[1]

Received: 2 April 2020 / Accepted: 24 August 2020 / Published online: 1 September 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Sepsis survivors present acute and long-term cognitive impairment and the pathophysiology of neurological dysfunction in sepsis involves microglial activation. Recently, the involvement of cytosolic receptors capable of forming protein complexes called inflammasomes have been demonstrated to perpetuate neuroinflammation. Thus, we investigated the involvement of the NLRP3 inflammasome activation on early and late brain changes in experimental sepsis. Two-month-old male Wistar rats were submitted to the sepsis model by cecal ligation and perforation (CLP group) or laparotomy only (sham group). Immediately after surgery, the animals received saline or NLRP3 inflammasome formation inhibitor (MCC950, 140 ng/kg) intracerebroventricularly. Prefrontal cortex and hippocampus were isolated for cytokine analysis, microglial and astrocyte activation, oxidative stress measurements, nitric oxide formation, and mitochondrial respiratory chain activity at 24 h after CLP. A subset of animals was followed for 10 days for survival assessment, and then behavioral tests were performed. The administration of MCC950 restored the elevation of IL-1β, TNF-α, IL-6, and IL-10 cytokine levels in the hippocampus. NLRP3 receptor levels increased in the prefrontal cortex and hippocampus at 24 h after sepsis, associated with microglial, but not astrocyte, activation. MCC950 reduced oxidative damage to lipids and proteins as well as preserved the activity of the enzyme SOD in the hippocampus. Mitochondrial respiratory chain activity presented variations in both structures studied. MCC950 reduced microglial activation, decreased acute neurochemical and behavioral alteration, and increased survival after experimental sepsis.

Keywords Sepsis · NLRP3 · Inflammasome · MCC950 · Neuroinflammation · Cognitive impairment

Introduction

In the last decade, there has been a decrease in mortality in patients with sepsis. Age-standardized sepsis incidence fell by 37% and mortality decreased by 52.8% from 1990 to 2017 [1]. In this sense, other challenges arise, especially those related to quality of life and acute and persistent neurological damage presented by survivors. Surviving an episode of sepsis represents a major risk for the development of long-term neurocognitive dysfunction affecting a patient's ability to live independently, as well as reducing his work ability [2]. Several studies have attributed these behavioral changes to neuronal damage during sepsis and the microglial activation is involved in this process [3–6]. When activated, microglial cells are capable of indirectly causing neuronal damage by releasing inflammatory mediators such as IL-1β and TNF-α, or by reducing their production of neurotrophins. Directly, microglial cells cause neuronal damage by activation of

✉ Fabricia Petronilho
fabricia.petronilho@unisul.br

[1] Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil

[2] Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciuma, SC, Brazil

[3] Laboratory of Experimental Neurology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciuma, SC, Brazil

[4] Translational Psychiatry Program, Faillace Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX 77054, USA

Experimental Gerontology 140 (2020) 111063

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Gerontology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/expgero

Aging influences in the blood-brain barrier permeability and cerebral oxidative stress in sepsis

Willian Margotti[a], Amanda Della Giustina[a], Mariana Pereira de Souza Goldim[a], Marcos Hubner[a], Thainá Cidreira[a], Taís Luise Denicol[a], Larissa Joaquim[a], Raquel Jaconi De Carli[a], Lucinéia Gainski Danielski[a], Kiuanne Lino Lobo Metzker[a], Sandra Bonfante[a], Tatiana Barichello[b], Fabricia Petronilho[a,*]

[a] Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina - UNISUL, Tubarao, SC, Brazil

[b] Translational Psychiatry Program, Faillace Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX 77054, USA

ARTICLE INFO

Section Editor: Stephane Baudry

Keywords:
Sepsis
Brain
Aging
Oxidative stress
Blood-brain barrier

ABSTRACT

Sepsis is a set of serious manifestations throughout the body produced by an infection, leading to changes that compromise cellular homeostasis and can result in dysfunction of the central nervous system. The elderly have a higher risk of developing sepsis than younger peoples. Under the influence of inflammatory mediators and oxidizing agents released in the periphery as a result of the infectious stimulus, changes occur in the blood-brain barrier (BBB) permeability, with neutrophil infiltration, the passage of toxic compounds, activation of microglia and production of reactive species that results in potentiation of neuroimmune response, with the progression of neuronal damage and neuroinflammation. The objective of this study is to compare BBB permeability and the development of oxidative stress in the hippocampus and prefrontal cortex of young and old rats submitted to polymicrobial sepsis induction. Male Wistar rats grouped into sham (60d), sham (210d), cecal ligation and perforation (CLP) (60d) and CLP (210d) with $n = 16$ per experimental group were evaluated using the CLP technique to induce sepsis. The brain regions were collected at 24 h after sepsis induction to determine BBB permeability, myeloperoxidase (MPO) activity as marker of neutrophil activation, nitrite/nitrate (N/N) levels as marker of reactive nitrogen species, thiobarbituric acid reactive substances as marker of lipid peroxidation, protein carbonylation as marker of protein oxidation, and activity of antioxidant enzyme catalase (CAT). There was an increase in the BBB permeability in the CLP groups, and this was enhanced with aging in both brain region. MPO activity in the brain regions increased in the CLP groups, along with a hippocampal increase in the CLP 210d group compared to the 60d group. The concentration of N/N in the brain region was increased in the CLP groups. The damage to lipids and proteins in the two structures was enhanced in the CLP groups, while only lipid peroxidation was higher in the prefrontal cortex of the CLP 210d group compared to the 60d. CAT activity in the hippocampus was decreased in both CLP groups, and this was also influenced by age, whereas in the prefrontal cortex there was only a decrease in CAT in the CLP 60d group compared to the sham 60d. These findings indicate that aging potentiated BBB permeability in sepsis, which possibly triggered an increase in neutrophil infiltration and, consequently, an increase in oxidative stress.

1. Introduction

Sepsis is a set of serious manifestations throughout the body produced by an infection. Its clinical manifestations include those associated with the infectious focus in question (Singer et al., 2016). In terms of epidemiological characteristics, the high rates of sepsis incidence and mortality have not changed in recent decades, leading the World Health Organization (WHO) to include sepsis in global health priorities (WHO, 2018). In the United States, the incidence of sepsis is 300 cases per 100,000 inhabitants, where ¼ of the patients who are

* Corresponding author at: Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina - UNISUL, Santa Catarina, SC, Brazil.
E-mail address: fabricia.petronilho@unisul.br (F. Petronilho).

https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111063
Received 10 February 2020; Received in revised form 20 July 2020; Accepted 17 August 2020
Available online 19 August 2020
0531-5565/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Microvascular Research 137 (2021) 104193

Contents lists available at ScienceDirect

Microvascular Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymvre

Folic acid alleviates the blood brain barrier permeability and oxidative stress and prevents cognitive decline in sepsis-surviving rats

Michele Novochadlo [a], Mariana Pereira Goldim [a], Sandra Bonfante [a], Larissa Joaquim [a], Khiany Mathias [a], Kiuanne Metzker [a], Richard Simon Machado [a], Everton Lanzzarin [a], Gabriela Bernades [a], Erick Bagio [a], Leandro Garbossa [a], Aloir Neri de Oliveira Junior [a], Naiana da Rosa [a], Jaqueline Generoso [b], Jucelia Jeremias Fortunato [a], Tatiana Barichello [b,c,d,e], Fabrícia Petronilho [a,*]

[a] Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil
[b] Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil
[c] Translational Psychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The University of Texas Health Science Center at Houston, McGovern Medical School, Houston, TX, USA
[d] Center of Excellence on Mood Disorders, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The University of Texas Health Science Center at Houston, McGovern Medical School, Houston, TX, USA
[e] Neuroscience Graduate Program, The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences at Houston, Houston, TX, USA

ARTICLE INFO

Keywords:
Sepsis
Blood brain barrier permeability
Oxidative stress
Folic acid

ABSTRACT

Sepsis is a complication of an infection which imbalance the normal regulation of several organ systems, including the central nervous system (CNS). Evidence points towards inflammation and oxidative stress as major steps associated with brain dysfunction in sepsis. Thus, we investigated the folic acid (FA) effect as an important antioxidant compound on acute brain dysfunction in rats and long term cognitive impairment and survival. Wistar rats were subjected to sepsis by cecal ligation and perforation (CLP) or sham (control) and treated orally with FA (10 mg/kg after CLP) or vehicle (veh). Animals were divided into sham + veh, sham + FA, CLP + veh and CLP + FA groups. Twenty-four hours after surgery, the hippocampus and prefrontal cortex were obtained and assayed for levels of blood brain barrier (BBB) permeability, nitrite/nitrate concentration, myeloperoxidase (MPO) activity, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation and protein carbonyls. Survival was performed during 10 days after surgery and memory was evaluated. FA reduced BBB permeability, MPO activity in hippocampus and pre frontal cortex in 24 h and lipid peroxidation in hippocampus and improves the survival rate after sepsis. Long term cognitive improvement was verified with FA in septic rats compared with CLP + veh. Our data demonstrates that FA reduces the memory impairment in 10 days after sepsis and mortality in part by decreasing BBB permeability and oxidative stress parameters in the brain.

1. Introduction

Sepsis is the most frequent cause of death in intensive care units (ICUs), and it is determined by a systemic inflammatory response associated with an infection (Singer et al., 2016). The central nervous system (CNS) is rapidly damaged during sepsis, causing sepsis-associated encephalopathy (SAE), which is clinically characterized by disorientation, delirium, or coma and is associated with an increased rate of mortality in ICU (Prescott et al., 2016).

The exact mechanisms for brain dysfunction in septic patients are far from clear. Currently, it is known that pathophysiology of SAE involves blood-brain barrier (BBB) disruption, mitochondrial and endothelial dysfunction and disturbances in neurotransmission, as well as impairment of neuronal metabolism and direct cellular damage to the brain (Danielski et al., 2018a). However, the involvement of oxidative stress is indeed the most tested and proven hypothesis, which may culminate in these pathophysiological events (Bozza et al., 2013). In a model of polymicrobial sepsis induced by CLP, oxidative damage occurs in the

* Corresponding author at: Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão 3621-3363, SC, Brazil.
E-mail address: fabricia.petronilho@unisul.br (F. Petronilho).

https://doi.org/10.1016/j.mvr.2021.104193
Received 14 October 2020; Received in revised form 18 March 2021; Accepted 26 May 2021
Available online 29 May 2021
0026-2862/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

Ref: The effect of modafinil on passive avoidance memory, brain level of BDNF and oxidative stress markers in sepsis survivor rats

Our referees have now considered your paper and have recommended publication in . We are pleased to accept your paper in its current form subject to an originality check using the Crossref Similarity Check™ software.

Once the originality check is complete, the paper will be forwarded to the Production Editor for copy editing and typesetting. The reviewer comments are included at the bottom of this letter.

Effective from 25th June 2011 accepted manuscripts will be published as Just Accepted articles in press within 2 days* of receipt of the accepted manuscript by the Publisher. Just Accepted articles will appear as submitted by the authors and will not have undergone any copyediting, typesetting, and proofreading. *Please note this is subject to the timely receipt of a signed Copyright Transfer Agreement from the author(s). The corresponding author will receive by email a copy of the Copyright Transfer Agreement once their accepted article is received by the Publisher. It is important that you follow the instructions as provided in the Publisher's email and return a signed Copyright Transfer Agreement to the Publisher as quickly as possible to avoid delaying the online publication of your accepted manuscript as a Just Accepted article.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course.

The publisher also requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for your contribution to The International Journal of Neuroscience and we look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,
Mohamad Bydon, MD
Editor-in-Chief, The International Journal of Neuroscience