

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Eduarda Jardim Ferreira da Silva

**ALTERAÇÕES ENCEFÁLICAS CRÔNICAS CAUSADAS POR EPISÓDIO
INFLAMATÓRIO SISTÊMICO GRAVE**

Porto Alegre

2021

Eduarda Jardim Ferreira da Silva

**ALTERAÇÕES ENCEFÁLICAS CRÔNICAS CAUSADAS POR EPISÓDIO
INFLAMATÓRIO SISTÊMICO GRAVE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientadora: Dra. Bruna Bellaver
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Rigon Zimmer

Porto Alegre

2021

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por ter me conduzido e guiado até aqui com seu infinito amor e bondade. Toda a honra e glória são para Ele!

Minha gratidão eterna ao meu marido Carlos Correa que esteve ao meu lado em todo esse tempo, suportando, cuidando, amando, acreditando e fazendo de tudo, da melhor forma possível, para que tudo ficasse mais leve e feliz. Sem ti, meu amor, sem dúvida, eu não teria conseguido chegar até aqui – Te amo!

Aos meus pais Carlos e Katia, e à minha irmã Lívia, por todo amor e cuidado desde o início da minha vida acadêmica até hoje. Vocês sempre acreditaram e investiram em mim, para que tudo que eu sonhasse se tornasse realidade. Hoje mais uma etapa concluída, e vocês são parte disso. Amo vocês!

À minha vó, tios, primos, sogros, cunhados e amigos especiais que, também, estiveram ao meu lado torcendo e intercedendo por mim nesse tempo. Obrigada pelo cuidado, carinho e amor que derramaram sobre a minha vida.

À minha querida orientadora Bruna Bellaver, que aceitou o desafio de me orientar. Obrigada pela paciência, por cada ensinamento, comprometimento, dedicação e auxílio para realização desse trabalho. Ao querido Prof. Eduardo Zimmer, por ter aberto a porta do laboratório a mim, ter me recebido de maneira acolhedora e ter dado todo o suporte necessário nesse tempo.

Agradeço também às colegas Andréia da Rocha e Pâmela Ferreira, que sempre estiveram me auxiliando nos experimentos, em conhecimento e que me receberam de uma forma tão incrível.

A todos os colegas do Zimmer Lab, por me receberem muito bem, pela convivência nesses dois anos e por me compartilharem tanto conhecimento e amor pela ciência.

“Escolham minha instrução em vez da prata e o conhecimento em vez do ouro puro. Pois a sabedoria vale muito mais que rubis, nada do que você deseja se compara a ela.”

Provérbios 8: 10-11

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
INTRODUÇÃO	12
1. Sepses, aspectos fisiológicos e bioquímicos	12
2. Encefalopatia associada à sepsis	13
3. Danos agudos e crônicos associados à sepsis	15
3.1 Comprometimento cognitivo associado à EAS.....	15
3.2 Dano à barreira sangue-cérebro induzido pela sepsis	16
3.3 Alterações astrocitárias relacionadas a inflamação sistêmica grave	18
3.4 Alterações induzidas pela inflamação sistêmica grave no metabolismo glutamatérgico cerebral	19
3.5 Alterações no metabolismo energético cerebral relacionadas a inflamação sistêmica grave	21
OBJETIVOS	23
Objetivo Geral	23
Objetivos Específicos	23
MATERIAIS E MÉTODOS	24
1. Desenho Experimental	24
2. Animais	24
3. Ligação cecal e perfuração (LCP) em ratos Wistar	25
4. Protocolo Experimental	26
5. Teste de Reconhecimento de Objetos	26
6. Citometria de fluxo	27
7. Tomografia por emissão de pósitrons (PET)	27

8. Captação de glutamato	28
9. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	29
10. Western blotting	30
11. Dosagem de proteínas	31
12. Análises estatísticas	31
RESULTADOS	32
1. Animais que sobrevivem a sepse apresentam comprometimento na memória declarativa	32
2. Inflamação sistêmica grave promove dano à BSC	33
3. Inflamação sistêmica grave promove alterações persistentes no metabolismo cerebral de glicose	35
4. A inflamação sistêmica grave não altera o metabolismo de glutamato a longo prazo	40
5. Sepse promove alterações persistentes em proteínas astrocitárias	43
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÃO	55
PERSPECTIVAS	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	57

RESUMO

A sepse é caracterizada por um processo inflamatório sistêmico grave que compromete funções vitais do organismo. A encefalopatia associada à sepse, é uma complicação neurológica associada que, causa disfunções no sistema nervoso central (SNC), como ruptura na barreira sangue-cérebro (BSC), comprometimento da função cognitiva, alterações a níveis metabólicos e celulares e, está relacionada a um aumento na taxa de mortalidade. Os eventos pelos quais a inflamação sistêmica promove danos tão significativos ao SNC, principalmente a longo prazo, ainda não estão completamente estabelecidos. Por essa razão, essa dissertação buscou investigar as alterações cerebrais persistentes após um episódio inflamatório sistêmico grave. Nossos resultados sugerem que os animais sobreviventes à indução de sepse por modelo de ligação cecal e perfuração apresentam um prejuízo na memória declarativa a longo prazo. Além disso, foi observado que o dano à BSC promovido pela sepse é persistente mesmo após a sua resolução. O estudo utilizando esse modelo também demonstrou uma diminuição no metabolismo de glicose cerebral, porém não foram evidenciadas alterações no metabolismo glutamatérgico. E, por fim, observamos que animais sobreviventes a inflamação sistêmica apresentam alterações persistentes em proteínas astrocitárias. Com esses resultados, evidenciamos que a inflamação sistêmica grave impacta, de forma persistente, na funcionalidade cerebral.

Palavras-chave: encefalopatia associada à sepse, metabolismo energético cerebral, astrócitos, barreira sangue-cérebro.

ABSTRACT

Sepsis is characterized by a severe systemic inflammatory process that compromises vital body functions. Sepsis-associated encephalopathy (SAE) is an associated neurological complication that causes dysfunction of the central nervous system (CNS), such as disruption of the blood-brain barrier (BBB), impairment cognitive functions, changes at metabolic and cellular levels. Additionally, SAE is related to an increased mortality rate. The events by which systemic inflammation promotes such significant damage to the CNS, especially in the long term, are not yet fully established. For this reason, this dissertation sought to investigate the brain changes that persist after a severe systemic inflammatory episode. Our results suggest that animals surviving the induction of sepsis by cecal ligation and perforation exhibit an impairment in long-term declarative memory. Furthermore, it was observed that the BBB damage promoted by sepsis is persistent even after its resolution. Our study also demonstrated a decrease in brain glucose metabolism, but no changes in glutamatergic metabolism were evident. Finally, we observed that animals surviving systemic inflammation presented persistent alterations in astrocyte proteins. Together, our results, evidenced that an episode of severe systemic inflammation persistently impacts on brain functionality.

Keywords: sepsis associated encephalopathy, cerebral energetic metabolism, astrocytes, blood brain barrier.

LISTA DE ABREVIATURAS

[¹⁸F] FDG: fluorodesoxiglicose

BSC: barreira sangue-cérebro

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

EAATs: transportadores de glutamato excitatórios

EAS: encefalopatia associada à sepse

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

GLAST: transportador glutamato-aspartato

GLT-1: transportador de glutamato 1

IFN- γ : interferon gama

IL: interleucina

LCP: ligadura cecal e perfuração

LCR: líquido cefalorraquidiano

LPS: lipopolissacarídeo

Mao-B: monoamina oxidase B

PBMC: células sanguíneas mononucleares

PET: tomografia por emissão de pósitrons

PMAD: padrões moleculares associados a danos

PMAP: padrões moleculares associados a patógenos

SNC: sistema nervoso central

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UTIs: unidades de terapia intensiva

INTRODUÇÃO

1. Sepses, aspectos fisiológicos e bioquímicos

A sepsis é definida como uma disfunção orgânica, que promove risco de vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à invasão e persistência de bactérias patogênicas na corrente sanguínea, caracterizando uma infecção disseminada. Não se caracteriza como uma doença em si, porém como uma resposta inflamatória sistêmica devido a infecção, queimadura, trauma ou outros fatores (Green, Scott et al. 2004, Singer, Deutschman et al. 2016, Komori, Abe et al. 2020). Extrapolações de dados populacionais de países de alta renda sugerem uma estimativa de incidência mundial de 31,5 milhões de casos de sepsis ao ano, com um potencial de 5,3 milhões de óbitos (Fleischmann, Scherag et al. 2016). Nas unidades de terapia intensiva (UTIs) brasileiras, a prevalência de sepsis em internações é de 25%, e a taxa de mortalidade nesses pacientes chega a 30% (Lobo, Rezende et al. 2019).

Diversos estudos têm demonstrado que a resposta fisiopatológica à sepsis é complexa e variável (Angus and van der Poll 2013, Prescott and Angus 2018, Huang, Cai et al. 2019). Primeiramente, em uma fase inicial, há ativação das vias pró-inflamatórias e vias imunes inatas anti-inflamatórias. Após, as características das alterações no sistema imune variam de acordo com o hospedeiro e o patógeno, além de intervenções médicas e/ou tratamentos. E, por fim, a última etapa, que quando bem-sucedida, se caracteriza pela resolução da inflamação. Contudo, já é bem estabelecido que muitos pacientes continuam apresentando alterações na

resposta inflamatória, incluindo supressão imunológica, mesmo após a resolução da inflamação aguda (Hotchkiss, Monneret et al. 2013, Prescott and Angus 2018).

Devido às disfunções orgânicas causadas pela sepse, sabe-se que há diversas lesões, a nível de órgãos e tecidos, causando inúmeras alterações musculares, cardíacas e cerebrais. Em nível molecular, ocorre a ativação de diferentes cascatas moleculares anti e pró-inflamatórias, e também a nível metabólico, pode haver redução no gasto de energia generalizado à nível celular e redução das funções orgânicas (Garcia-Alvarez, Marik et al. 2014, Gotts and Matthay 2016).

2. Encefalopatia associada à sepse

A encefalopatia associada à sepse (EAS) é considerada uma complicação neurológica crítica durante o desenvolvimento da sepse, ou seja, ocorre sem que haja lesão infecciosa direta no tecido nervoso ou outros tipos de encefalopatias. Apesar da falta de infecção direta, evidências laboratoriais de disfunção do sistema nervoso central (SNC), como acidente vascular encefálico hemorrágico, lesões inespecíficas da substância branca cortical e, níveis elevados de proteínas, como a albumina, no líquido cefalorraquidiano (LCR) em pacientes internados são comuns na EAS (Gofton and Young 2012). A EAS é frequentemente encontrada em pacientes críticos internados em UTIs e em até 70% dos pacientes com infecção sistêmica grave (Shulyatnikova and Verkhatsky 2020). A EAS apresenta um espectro clínico que pode variar de leve desorientação, agitação e hipersonolência,

a distúrbios mais graves de consciência, alterações na memória, atenção, concentração e prejuízo na qualidade de vida em pacientes sobreviventes (Chaudhry and Duggal 2014).

Fisiopatologicamente, a EAS apresenta uma certa complexidade, afetando células cerebrais (como neurônios e células gliais), interações celulares (como interações neurônio-glia), bem como estruturas cerebrais inteiras responsáveis por importantes funções como memória, atenção e consciência (Gotts and Matthay 2016). Dentre as diversas regiões cerebrais afetadas pelo desenvolvimento do quadro de EAS, córtex e hipocampo se destacam como regiões de interesse pois estão associadas à diversas alterações na patologia da doença (Chaudhry and Duggal 2014). O córtex, pois é responsável por funções cerebrais complexas como a linguagem e o processamento de informações (Bartels and Zeki 2005) e o hipocampo, que desempenha papéis cruciais na funcionalidade cerebral incluindo regulação emocional, atividade hormonal, mas sua função mais bem reconhecida é relacionada aos processos do aprendizado e formação de memória (Opitz 2014). Estudos têm mostrado ainda que esta estrutura se apresenta como uma das regiões mais vulneráveis a danos inflamatórios e isquêmicos (Lim, Alexander et al. 2004, Semmler, Widmann et al. 2013)

Os mecanismos pelos quais a inflamação sistêmica promove danos tão significativos ao SNC, ainda não estão completamente estabelecidos. Evidências já demonstram que o desenvolvimento de um processo de neuroinflamação, disfunção da barreira sangue-cérebro (BSC), isquemia e excitotoxicidade parecem ser os principais processos implicados na EAS (Adam, Kandelman et al. 2013, Mazeraud,

Pascal et al. 2016, Chung, Wickel et al. 2020). Estudos evidenciam que os pacientes que sobrevivem à sepse apresentam maior suscetibilidade a desenvolver um declínio funcional e neurocognitivo, juntamente com um risco aumentado de mortalidade a longo prazo. (Kissoon, Reinhart et al. 2017, Machado, Cavalcanti et al. 2017). Além disso, a EAS está associada a anormalidades neurocomportamentais, redução da qualidade de vida e aumento da morbidade, gerando uma carga substancial para os pacientes e sistemas de saúde (Iwashyna, Ely et al. 2010, Ji, Xia et al. 2018).

Atualmente não existe uma terapia específica para a EAS, sendo assim a compreensão dos seus mecanismos fisiológicos e patológicos são essenciais para prevenção e potenciais intervenções a fim de evitar consequências a longo prazo encontradas nos pacientes acometidos por EAS.

3. Danos agudos e crônicos relacionados à EAS

Após a resolução da sepse há uma melhora nos sintomas dos pacientes e, com isso, os mesmos deixam os hospitais para retornarem a suas vidas. Porém, a longo prazo, alguns danos, principalmente cerebrais, são evidenciados nesses indivíduos sobreviventes a sepse.

3.1 Comprometimento cognitivo associada à EAS

Mais de 50% dos sobreviventes de sepse sofrem de algum tipo de disfunção cognitiva que afeta predominantemente a memória geral, atenção, fluência verbal e função executiva na alta hospitalar (Lamar, Hurley et al. 2011). Em uma proporção

significativa, a neuroinflamação pode levar a uma disfunção cognitiva persistente, que cada vez mais parece preceder os distúrbios neurodegenerativos, como, por exemplo, a doença de Alzheimer (Ferrari, Pott Godoy et al. 2006, Annane and Sharshar 2015). Diversos estudos têm demonstrado que pacientes sobreviventes de sepse apresentam fator de risco, como inflamação sistêmica, para comprometimento cognitivo e doenças neurodegenerativas (Kamer 2010, Widmann and Heneka 2014, Prescott and Angus 2018, Mostel, Perl et al. 2019). Evidências experimentais também já relatam que 10 dias após a indução à inflamação sistêmica por ligadura cecal e perfuração (LCP), há comprometimento significativo da memória desses animais, porém estudos mais robustos a longo prazo ainda são necessários (Barichello, Martins et al. 2007, Olivieri, Michels et al. 2018).

Sequelas cognitivas a longo prazo após doenças críticas, como a sepse, causam um grande ônus ao sistema de saúde, gerando altos custos socioeconômicos, emergindo de um risco aumentado de hospitalizações repetidas, acomodação em lares de idosos, capacidade de trabalho reduzida de cuidadores e morte prematura (Langa, Chernew et al. 2001, Prescott, Langa et al. 2014). Portanto, estudos de longo prazo são necessários para melhor conhecimento dos danos cerebrais associados à sepse e busca de alvos terapêuticos.

3.2 Dano à barreira sangue-cérebro induzido pela sepse

A sepse pode induzir alterações agudas e crônicas no SNC, comprometendo diversos aspectos funcionais, como manutenção da integridade da BSC. A BSC é uma interface biológica altamente seletiva e semipermeável encontrada entre o parênquima cerebral e a circulação sanguínea. A manutenção da sua integridade

garante uma função e homeostase cerebral normais (De Luca, Colangelo et al. 2018). O comprometimento da BSC, promovido pela inflamação sistêmica exacerbada, se inicia quando as células imunes reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) ou danos (DAMPs), codificando um sinal de perigo ao hospedeiro (Ransohoff, Schafer et al. 2015). O reconhecimento desses padrões gera a ativação de células sanguíneas mononucleares (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) que liberam diversos mediadores inflamatórios, como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL), em especial IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10 (Friberg, Bryant et al. 1994, Katial, Sachanandani et al. 1998). Esses mediadores são enviados através do sangue para outros sítios afetados pela inflamação, incluindo o cérebro. No cérebro, esses mediadores contribuem para disfunção neuronal, ativando células gliais e o endotélio vascular (isquemia) e essas disfunções acabam aumentando a permeabilidade e causando rupturas na BSC, acarretando em dano cerebral (Hughes, Patel et al. 2012, Nwafor, Brichacek et al. 2019).

Alterações na permeabilidade da BSC já foram observadas em pacientes sépticos, que apresentam níveis mais elevados de proteínas no LCR do que pacientes saudáveis (Davies 2002). Estudo em modelos animais também vêm demonstrando ativação de células pró-inflamatórias durante a fase aguda da sepse, que contribuem para a ativação e disfunção das células endoteliais cerebrovasculares, consequentemente aumentando a permeabilidade da BSC (du Moulin, Paterson et al. 1985, Gofton and Young 2012). Contudo, se essas

alterações de BSC persistem após a resolução da inflamação ainda precisa ser investigado.

3.3 Alterações astrocitárias relacionadas a inflamação sistêmica grave

A EAS também é conhecida por promover alterações a nível celular. Nesse sentido, os astrócitos são um tipo celular glial que desempenham importantes propriedades fisiológicas e, se relacionam intimamente com a manutenção da homeostase do SNC. Dentre as principais funções astrocitárias destaca-se: liberação de fatores neurotróficos, suporte ao desenvolvimento neuronal, participação no metabolismo de neurotransmissores, modulação e plasticidade sináptica e formação e manutenção da BSC (Dong and Benveniste 2001, Abbott, Ronnback et al. 2006).

Após algum tipo de injúria ou ameaça, uma resposta astrocitária é desencadeada, processo denominado reatividade astrocitária. Esse fenômeno se caracteriza por alterações tanto moleculares quando funcionais, como por exemplo, hiperplasia e/ou hipertrofia celular, proliferação, alteração na expressão de proteínas do citoesqueleto, como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a vimentina, e liberação de diversas moléculas, como mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos, que influenciam nos diferentes tipos celulares cerebrais (Escartin, Guillemaud et al. 2019, Escartin, Galea et al. 2021). A GFAP é uma proteína de filamento intermediário tipo III e está presente no citoesqueleto dos astrócitos. Ela apresenta uma função de manutenção mecânica e formato astrocitário, de suporte estrutural dos neurônios e da BSC (Middeldorp and Hol 2011). Estudos de fase

aguda mostram que a sepse induz a reatividade astrocitária, observado através do aumento dos níveis de GFAP, contudo, se esta alteração está associada à disfunção cognitiva de longo prazo causada pela sepse ainda precisa ser elucidado (Gasparotto, Girardi et al. 2018, Bellaver, Rocha et al. 2019)

A monoamina oxidase B (Mao-B) é uma enzima também presente predominantemente nos astrócitos, cuja principal função é catalisar a desaminação oxidativa de diversas amins biológicas, como monoaminas neurotransmissoras e neuromoduladoras (como dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina), que são relacionadas com o movimento, cognição e comportamento, e se apresenta também como um importante marcador de reatividade astrogliar (Ekblom, Jossan et al. 1993, Carter, Herholz et al. 2019). Estudos em humanos têm demonstrado que o aumento da expressão da Mao-B cerebral, que ocorre durante o envelhecimento, contribui para o aumento do estresse oxidativo e por isso pode ter um papel na vulnerabilidade do sistema dopaminérgico cerebral levando à neurodegeneração (Cohen 1990, Fowler, Volkow et al. 1999).

3.4 Alterações induzidas pela inflamação sistêmica grave no metabolismo glutamatérgico cerebral

O glutamato, ou ácido glutâmico, é considerado o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Além de ser responsável por parte da neurotransmissão excitatória rápida, também parece ser mediador da informação sensorial, cognitiva, motora e emocional (Ozawa, Kamiya et al. 1998, Meldrum 2000). As concentrações de glutamato na fenda sináptica são mantidas a baixos níveis de maneira fortemente regulada. Ainda não se conhecem enzimas que sejam capazes de degradar o

glutamato extracelular, então a captação de glutamato da fenda sináptica por astrócitos e neurônios é de extrema importância para que ocorra a sua reciclagem (Choi 1994). Assim, quando há um desequilíbrio nesse sistema regulatório podem ocorrer efeitos deletérios, seja por indução de hiperexcitabilidade e excitotoxicidade em neurônios pós-sinápticos, ou perturbação da sinalização glutamatérgica (Doble 1999, Danbolt 2001).

A recaptção de glutamato é realizada por transportadores de glutamato excitatórios (EAATs). Cinco tipos diferentes de EAATs são conhecidos atualmente, são eles: GLAST (transportador de glutamato aspartato, EAAT1), GLT-1 (transportador de glutamato 1, EAAT2), EAAC1 (transportador de aminoácido excitatório 1, EAAT3), EAAT4 (transportador de aminoácido excitatório 4) e EAAT 5 (transportador de aminoácido excitatório 5) (Tanaka 2000). GLAST e GLT-1 distribuem-se nas membranas plasmáticas dos astrócitos associadas a contatos sinápticos excitatórios. Enquanto o GLT-1 é encontrado em todo o cérebro, mas com maior abundância no córtex, hipocampo e corpo estriado (Vandenberg and Ryan 2013), o GLAST é o principal transportador localizado no cerebelo, ouvido interno e, retina (Danbolt 2001). Além de ser o transportador de glutamato mais abundante no cérebro, o GLT-1 é também o mais importante na recaptção de glutamato, sendo responsável por mais de 90% da captação desse neurotransmissor no cérebro (Holmseth, Scott et al. 2009, Pavić, Holmes et al. 2019).

Alguns estudos já evidenciaram alterações no metabolismo glutamatérgico associados à sepse. Em culturas celulares astrocíticas submetidas a um ambiente

inflamatório [modelo de lipopolissacarídeo (LPS)] foi observada uma redução de 50% da captação de glutamato em 24 h (Korcok, Wu et al. 2002). Além disso, outro estudo recente do nosso grupo demonstrou em culturas de astrócitos e fatias hipocâmpais de animais após 24 h de indução à sepse uma diminuição na captação de glutamato (Bellaver, Rocha et al. 2019). Porém, estudos ainda são necessários para determinarmos se essas alterações são persistentes nos animais sépticos a longo prazo.

3.5 Alterações no metabolismo energético cerebral relacionadas a inflamação sistêmica grave

Alterações no metabolismo energético cerebral, principalmente na fase aguda da sepse, já foram demonstradas. Mais especificamente uma diminuição na captação de [¹⁸F] FDG cerebral em modelos de inflamação sistêmica induzidos por LPS foi observada, quando comparados ao controle (Semmler, Widmann et al. 2013, Catarina, Luft et al. 2018). Catarina et al. demonstrou um hipometabolismo cerebral tão cedo quanto 12 h após a indução à sepse através de LPS, porém o metabolismo em diferentes regiões cerebrais não foi avaliado nesse estudo (Catarina, Luft et al. 2018). Já Bellaver et. al. demonstrou em animais induzidos à sepse através de LCP um hipometabolismo de [¹⁸F] FDG em diversas regiões cerebrais (Bellaver, Rocha et al. 2019). Alterações no metabolismo energético após a resolução da sepse ainda precisam ser melhor estudadas.

Os astrócitos também participam diretamente da regulação do metabolismo energético cerebral. A contribuição dessas células foi evidenciada inicialmente em culturas primárias, onde a presença de glutamato foi capaz de estimular

significativamente a captação de glicose e a liberação de lactato. Assim, nesse estudo observou-se que o glutamato estimula a glicólise anaeróbia em astrócitos, e sugere-se que o lactato liberado seja enviado aos neurônios, onde será utilizado como fonte de energia (Pellerin and Magistretti 1994). Além disso, um estudo mais recente demonstrou a existência de um acoplamento *in vivo* entre a captação de glutamato e o metabolismo de glicose cerebral, mediado por astrócitos, através da utilização do radiotraçador [¹⁸F] fluordesoxiglicose ([¹⁸F] FDG). Nesse estudo, o antimicrobiano ceftriaxona foi utilizado para estimular o transporte de glutamato em astrócitos, via GLT-1, resultando em um aumento do sinal de [¹⁸F] FDG, principalmente em regiões onde há enriquecimento de GLT-1 (Zimmer, Parent et al. 2017). Com isso, foi evidenciado um importante link entre o metabolismo glutamatérgico astrocitário e o consumo de glicose pelas células cerebrais.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

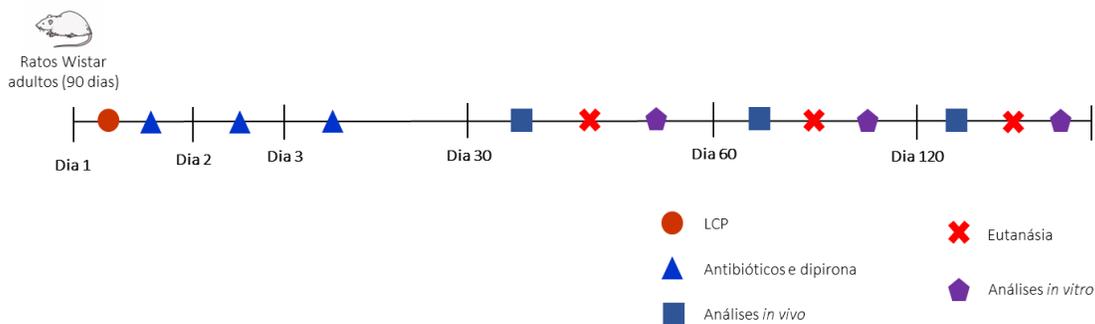
Investigar as alterações cerebrais persistentes após um episódio inflamatório sistêmico grave.

Objetivos Específicos

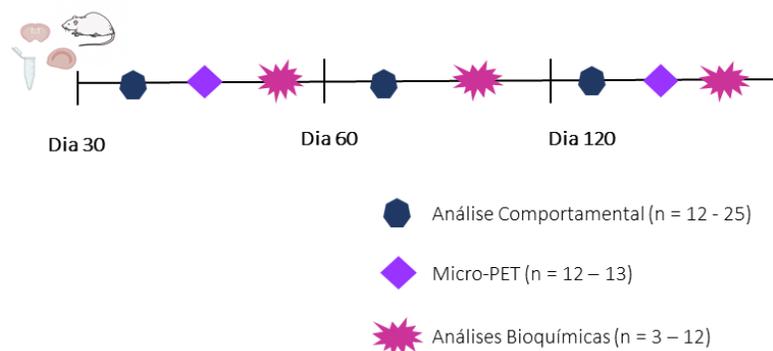
1. Verificar memória declarativa a longo prazo em modelo animal de LCP;
2. Avaliar a persistência do dano à BSC após indução à inflamação sistêmica grave;
3. Avaliar o metabolismo energético cerebral após recuperação de um episódio de inflamação sistêmica grave;
4. Elucidar o impacto persistente da sepse na reatividade astrocitária de animais submetidos à sepse.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho Experimental



Coorte Experimental:



Animais

Ratos Wistar machos adultos (90 dias de idade) foram divididos em dois grupos: sham (n = 33; peso corporal médio = 325 g) e sepse (n = 37; peso corporal médio = 321 g). Todos os animais foram obtidos da colônia de reprodução do Departamento de Bioquímica, UFRGS, e, mantidos em ambiente controlado (ciclo claro de 12 h / escuro de 12 h; 22 ± 1°C; acesso *ad libitum* a comida e água). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Uso e Cuidado de

Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (número do processo: 37451).

Ligadura cecal e perfuração (LCP) em ratos Wistar

Para a indução da inflamação sistêmica, os ratos Wistar foram submetidos ao LCP conforme descrito anteriormente (Bellaver, Rocha et al. 2019). Os ratos foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina, administradas via intraperitoneal. Uma laparotomia mediana de aproximadamente 3 cm foi realizada para permitir a exposição do ceco com o intestino adjacente. O ceco foi então ligado com sutura de náilon 3.0 em sua base, abaixo da válvula ileocecal, mantendo a continuidade do fluxo intestinal, e foi perfurado uma vez com agulha de calibre 14 gauge. O ceco foi então suavemente espremido para expelir uma pequena quantidade de material fecal do local da perfuração e, em seguida, devolvido à cavidade peritoneal. A laparotomia foi fechada com sutura de náilon 4.0 e os ratos devolvidos para às suas gaiolas. Todas as cirurgias foram realizadas do turno da manhã. Os animais foram hidratados com solução salina (50 mL/kg por via subcutânea) imediatamente e 8 h após a LCP. No grupo sham, os ratos foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos, mas o ceco não foi ligado nem perfurado. Na ausência de antibioticoterapia, a taxa de mortalidade neste modelo foi de 100% após 72 h. Por essa razão, os animais receberam 30 mg/kg de ciprofloxacino e 25 mg/kg de metronidazol por gavagem, de 12 em 12 h por um total de 3 dias. Dipirona sódica com sabor em suspensão de 0,5% foi fornecida na água de beber por 3 dias após a cirurgia.

Protocolo Experimental

Após a indução a inflamação sistêmica grave por ligadura cecal e perfuração, os animais sobreviventes foram acompanhados por 30, 60 e 120 dias. Os mesmos animais foram utilizados nos diferentes pontos da curva temporal e todos foram submetidos aos experimentos descritos abaixo.

Teste de reconhecimento de objeto

O teste de reconhecimento de objeto foi utilizado para medir a memória a longo prazo dos animais. O experimento foi conduzido em uma sala com atenuação de som sob luz de baixa intensidade e objetos distintos foram utilizados em cada teste. O protocolo, conforme descrito por Ennaceur, Cavoy, é baseado na exploração diferencial de objetos novos e familiares, e consiste em fase de habituação, de amostra e de discriminação (Ennaceur, Cavoy et al. 1989). Na habituação, os animais podem explorar livremente o campo aberto por 10 minutos e, posteriormente foi analisada a distância total percorrida, a fim de verificar a locomoção dos animais. Na amostragem, que aconteceu 24 h após a habituação, dois objetos idênticos (O1 e O2) foram posicionados dentro do campo aberto, distantes cerca de 15 cm das paredes e aproximadamente 20 cm entre eles. Os animais exploraram livremente os objetos por 5 minutos. Na discriminação, após 24 h da fase anterior, foi posicionado um objeto familiar (O3), o mesmo da fase anterior, em campo aberto junto com um novo objeto (T) nos mesmos locais anteriormente ocupados por O1 e O2. Os ratos exploraram livremente os objetos por 5 minutos. A exploração do objeto foi definida como direcionar o nariz a menos ou igual 2 cm ou

tocá-lo diretamente com o nariz. Os dados foram analisados usando o tempo total explorando o objeto novo e o objeto familiar (O3 + T) na fase de discriminação, e a porcentagem da discriminação foi definida pelo tempo total multiplicado por 100 dividido pelo tempo no objeto novo ($\text{Tempo total} \times 100 / T$).

Citometria de Fluxo

A presença de células no LCR foi determinada através da técnica de citometria de fluxo. O LCR foi retirado da cisterna magna dos animais 30 dias após a indução cirúrgica de sepse com o auxílio de uma seringa ultrafina (0,25 mm de calibre). Somente amostras sem contaminação com sangue foram analisadas. A contagem de células foi realizada em citômetro BD Calibur.

Tomografia por emissão de pósitrons (PET)

Os animais sobreviventes foram escaneados 30 dias (sham n = 12; sepse n = 13) e 120 dias (sham n = 10; sepse n = 8) após a indução cirúrgica de sepse. Os animais foram anestesiados individualmente com uma mistura de isoflurano e oxigênio medicinal (3-4% da dose de indução) e injetados com 0,4 mL de [¹⁸F] FDG na veia caudal, após jejum de 12-16 h. Em seguida, cada animal foi devolvido à sua respectiva gaiola por 40 minutos para metabolismo *in vivo* de [¹⁸F] FDG. Após o período de captação, cada rato foi colocado em posição de prona e escaneado com o Triumph™ micro-PET [LabPET-4, TriFoil Imaging, Northridge, CA, USA, (para informações técnicas do LabPET-4, olhar (Bergeron, Cadorette et al. 2014)) sob anestesia inalatória (dose de manutenção de 2-3%). Ao longo do procedimento, os

animais foram mantidos em almofada aquecida à 37°C. Para leitura do radiotraçador, aquisições estáticas foram adquiridas por 10 minutos com o campo de visão (FOV; 3,75 cm) centrado na cabeça de cada rato (Zanirati, Azevedo et al. 2018, Bellaver, Rocha et al. 2019). Todos os dados foram reconstruídos utilizando o algoritmo do método de estimativa de máxima verossimilhança (MLEM-3D) com 20 interações. Cada imagem de micro-PET foi reconstruída com um tamanho de voxel de 0,2 x 0,2 x 0,2 mm e espacialmente normalizada em um modelo de [¹⁸F] FDG usando a normalização do cérebro em PMOD v3.8 e a ferramenta Fuse It (PFUSEIT) (PMOD Technologies, Zurique, Suíça). Um modelo de MRI de rato foi utilizado para sobrepor as imagens normalizadas previamente e co-registradas no banco de dados de imagens micro-PET.

Captação de glutamato

A captação de glutamato foi realizada em fatias corticais e hipocâmpais, e foram incubadas a 37 °C em HBSS contendo os seguintes componentes (em mM): 137 NaCl, 5,36 KCl, 1,26 CaCl₂, 0,41 MgSO₄, 0,49 MgCl₂, 0,63 Na₂HPO₄, 0,44 KH₂PO₄, 4,17 NaHCO₃ e 5,6 glicose, ajustado em pH 7,4. O experimento inicia pela adição de 100 µM de L-glutamato e 0,31µCi/ml de L- [2,3-³H] glutamato. A incubação foi interrompida em 10 minutos após a adição, onde o meio foi removido e os poços lavados duas vezes com HBSS gelado. As células foram lisadas em uma solução de NaOH 0,5M. A radioatividade incorporada foi medida em um cintilador. A captação independente de sódio foi determinada usando metil-D-glucamina ao

invés de cloreto de sódio. A captação de glutamato dependente de sódio foi obtida subtraindo a captação independente de sódio da captação total.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE foi realizada para avaliar os níveis de glutamato no LCR dos ratos 30 e 120 dias após a indução cirúrgica à sepse (n = 38). O LCR foi filtrado (poro de 0,02 µm), as amostras foram derivatizadas com o-flaldeído e a separação foi realizada com uma coluna de fase reversa (Supelcosil LC-18, 250 mm x 4,6 mm, Supelco) em um sistema de cromatografia Shimadzu Classe-VP. A fase móvel fluiu a uma taxa de 1,4 mL / min. e a temperatura da coluna era de 24 ° C. A composição do tampão foi A: tampão monohidrato de di-hidrogenofosfato de sódio 0,04 mol / L, pH 5,5, contendo 20% de metanol; B: tampão monohidrato de di-hidrogenofosfato de sódio 0,01 mol / L, pH 5,5, contendo 80% de metanol. O perfil do gradiente foi modificado de acordo com o conteúdo do tampão B na fase móvel: 0% por 0 min, 100% por 55 min, 0% por 55–60,00 min. A absorvância de excitação e emissão foram lidas a 360 nm e 455 nm, respectivamente, com detector de fluorescência Shimadzu.

Também foram dosados os níveis de albumina em LCR, que é utilizada para avaliar a integridade da BSC (Tumani, Huss et al. 2017). Utilizou-se CLAE acoplada a detector de Fluorescência (DFL) composto por sistema LC Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-20AT, desgaseificador DGU-14A, termostato para coluna CTO-10A e detector de fluorescência RF 20A. O software utilizado na aquisição e processamento dos dados foi o LC Solution. O DFL foi estabelecido em

278 nm (excitação) e 335 nm (emissão). Foi usada a coluna Agilent ZORBAX SB-C18 de fase reversa (tamanho de partícula de 5 µm, 250 × 4,6 mm i.d.). O método foi realizado usando condição de gradiente, consistindo em solvente A (H₂O + 0,1% de ácido fórmico) e solvente B (acetonitrila (ACN)) como segue: A → 65% B → 35% (0–5,0 min), A → 70% B → 30% (5,0–10 min), A → 65% B → 35% (10,0–17,0 min). A taxa de fluxo foi fixada em 0,7 mL/min. A orientação bioanalítica da FDA complementada pela EMA foi usada para realizar a validação do método.

As soluções estoque de albumina foram preparadas em água a 1 mg/mL e armazenadas a -20 ± 2 ° C. Para cada dia de análise, foram preparadas soluções padrão de albumina a 0,1, 0,5, 1, 10, 50 e 100 µg / mL. A preparação da amostra foi realizada adicionando 10 µl de LCR a 40 µl de ACN e foram misturados no vórtex. Em seguida, a solução foi transferida para frascos cônicos e 10 µL foram injetados.

Western Blotting

Para os experimentos de western blotting foram utilizados tecidos de hipocampo e córtex, os quais foram homogeneizados com tampão RIPA, centrifugados à 3000RPM a 4°C por 10 minutos, e as proteínas do sobrenadante foram medidas através do método do ácido bicinonínico com albumina bovina como padrão. As amostras foram padronizadas com tampão contendo 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol, 0,004% azul de bromofenol e 0,125 M Tris-HCl, de acordo com o teor de proteína de cada amostra.

As amostras foram separadas por SDS/PAGE (2 µg/µl de proteína) e transferidas para membranas de nitrocelulose, que foram incubadas overnight (4°C)

com um dos seguintes anticorpos: anti-GFAP (1:1000), anti-GLT-1 (1:1000), anti-Mao-B (1:1000) ou anti- β -tubulina (1:1000). A β -tubulina foi utilizada como controle de pipetagem. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (anti-coelho conjugado com peroxidase; 1:5000) por 1 h. Os anticorpos das proteínas analisadas e do controle endógeno foram incubados na mesma membrana. Todos os anticorpos utilizados são provenientes da empresa Abcam. Os sinais de quimioluminescência foram detectados em sistema Image Quant LAS4010 (GE Healthcare) usando um kit ECL.

Dosagem de proteínas

O conteúdo de proteínas foi mensurado usando o método do ácido bicinconínico com albumina de soro bovino como padrão (Smith, Krohn et al. 1985).

Análises Estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (dp). Todos os dados apresentaram distribuição normal e as comparações entre os grupos sham e sepsis foram realizadas utilizando o teste t. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 8.

RESULTADOS

Animais que sobrevivem à sepse apresentam comprometimento na memória declarativa

Os animais foram submetidos ao teste de campo aberto 30, 60 e 120 dias após LCP. Avaliamos nesses períodos a distância total percorrida pelos animais e, observamos não houve diferença significativa no grupo sepse, em comparação ao sham, indicando que todos os animais estavam se locomovendo igualmente (**Fig 1A - C**).

Os animais também foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos 30, 60 e 120 dias após a indução de inflamação sistêmica grave. Observamos em 30 dias após a indução de sepse que os animais, tanto do grupo sham quanto do grupo sepse, exploraram menos tempo o objeto familiar do que o objeto novo, indicando que ambos os grupos foram capazes de consolidar o aprendizado (**Fig. 1D**).

O mesmo teste foi realizado 60 dias após a indução da sepse, onde observamos que o grupo sham explorou menos tempo o objeto familiar do que o objeto novo. Já o grupo sepse não apresentou diferença significativa no tempo de exploração entre os dois objetos, indicando que não houve consolidação do aprendizado nesse grupo (**Fig. 1E**). Em 120 dias após a sepse, observamos na **Fig. 1F** que ambos os grupos não apresentaram diferença entre os tempos de exploração entre os objetos.

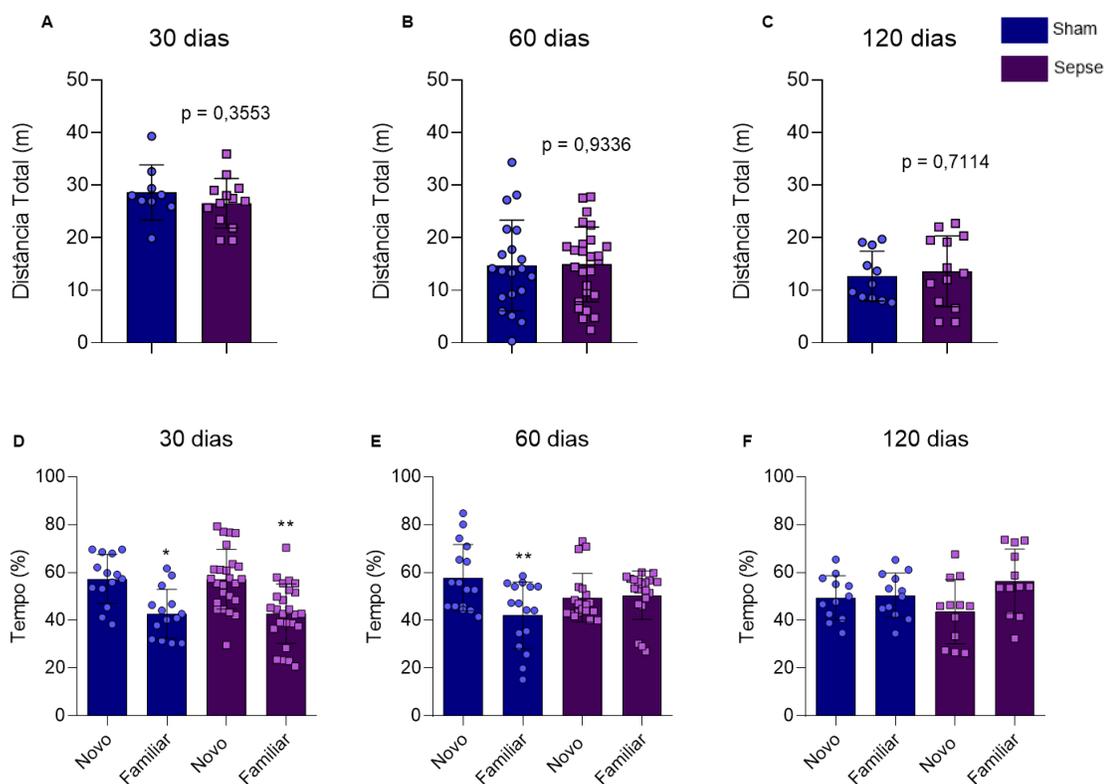


Figura 1. Distância total percorrida pelos animais 30 (A), 60 (B) e 120 (C) dias após indução à LCP. Teste de reconhecimento de objeto realizado nos animais 30 (D), 60 (E) e 120 dias (F) após a indução cirúrgica à sepse. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão dos grupos ($n = 12-25$). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (teste t).

Inflamação sistêmica grave promove dano à BSC

Determinamos o dano a longo prazo na BSC causado após um episódio de inflamação sistêmica grave através da dosagem de albumina presente no LCR. Em 30 dias após a indução cirúrgica à sepse evidenciamos um aumento significativo nos níveis de albumina no grupo sepse quando comparado ao sham (**Fig. 2A**; sham = $0,19 \pm 0,07$; sepse = $0,68 \pm 0,44$; $p = 0,0234$). De maneira interessante, no período de 120 dias após a recuperação dos animais observamos que ainda há um aumento

dos níveis de albumina no LCR dos animais sepse quando comparados ao sham (**Fig. 2B**; sham = $0,16 \pm 0,06$; sepse = $0,37 \pm 0,18$; $p = 0,0018$).

Além disso, no período de 30 dias após a LCP, evidenciamos um aumento da celularidade no LCR dos animais sepse quando comparados ao controle (Fig. 2C), indicando a presença de células sanguíneas que são enviadas ao cérebro, provavelmente devido ao dano de BSC, causado pela resposta inflamatória exacerbada.

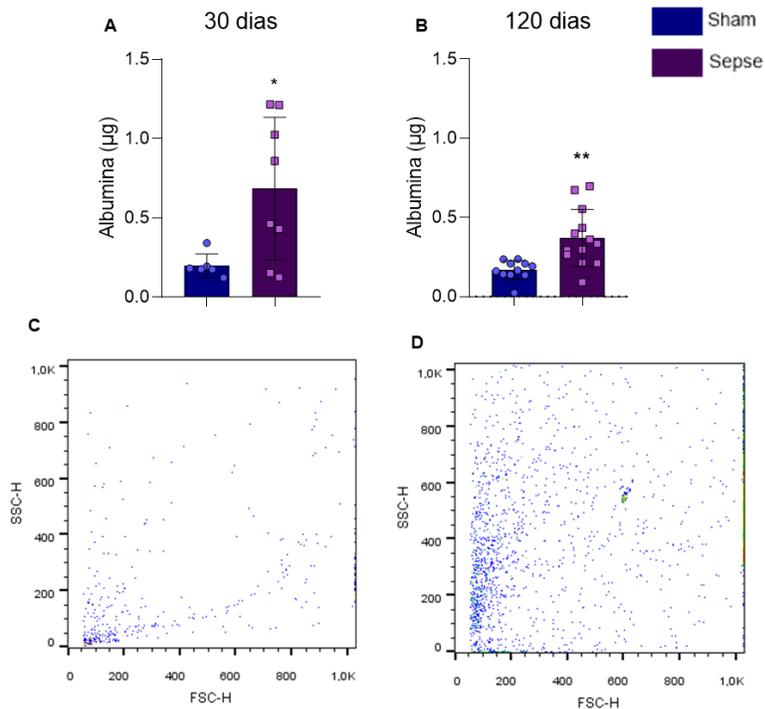


Figura 2. Níveis de albumina no LCR em 30 (A) e 120 (B) dias após sepse. Contagem de células no LCR dos animais sham (C) e sepse (D) 30 dias após a indução cirúrgica à sepse. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão dos grupos ($n = 6-13$). $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ (teste t).

Inflamação sistêmica grave promove alterações persistentes no metabolismo cerebral de glicose

Para avaliar alterações à longo prazo no metabolismo de glicose cerebral promovidas pela indução de inflamação sistêmica, analisamos as imagens de micro-PET utilizando [¹⁸F] FDG como radiotraçador. As imagens de PET-FDG sugerem uma diminuição na captação de glicose nos animais 30 dias após a indução cirúrgica de sepse em comparação aos seus controles (**Fig. 3A, B**), porém a quantificação da captação de [¹⁸F] FDG no cérebro total, apesar de apresentar uma tendência, não demonstrou-se significativa no grupo sepse, quando comparado ao sham (**Fig. 3C** $SUVr = 1,36 \pm 0,1$; $SUVr \text{ sepse} = 1,269 \pm 0,1474$). Contudo, a **Fig. 3D** apresenta um mapa de porcentagem de alteração, calculadas voxel-a-voxel, em que podemos observar diferentes porções cerebrais variando entre 4% e 15%. O mapa t-estatístico apresentado na **Fig. 3E** evidencia todas as regiões alteradas significativamente.

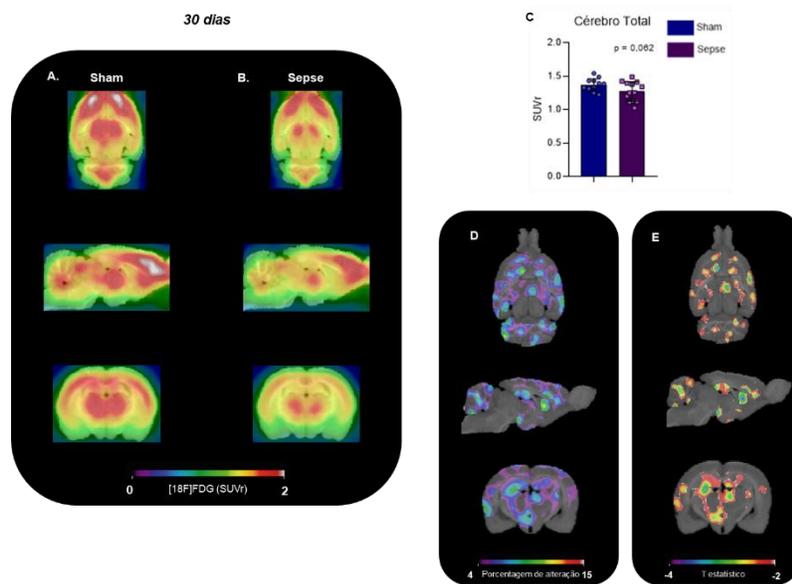


Figura 3. Captação de [^{18}F] FDG no cérebro total dos animais sham (A) e sepse (B). Quantificação de captação de glicose de cérebro total (C). Porcentagem de alteração entre os grupos sham e sepse (D). Mapa t estatístico sobreposto a atlas histológico (E). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão dos grupos ($n = 12-13$; teste t).

Por fim, a avaliação da captação de [¹⁸F] FDG em diferentes regiões cerebrais demonstrou uma diminuição na captação de glicose nos animais sepse em hipocampo (**Fig. 4A**; sham = 1,54 ± 0,12; sepse = 1,41 ± 0,17; p = 0,048) e estriado (**Fig. 4B**; sham = 1,70 ± 0,10; sepse = 1,54 ± 0,22; p = 0,0314). As demais regiões analisadas não apresentaram diferença estatística entre os grupos (**Fig. 4C – G**).

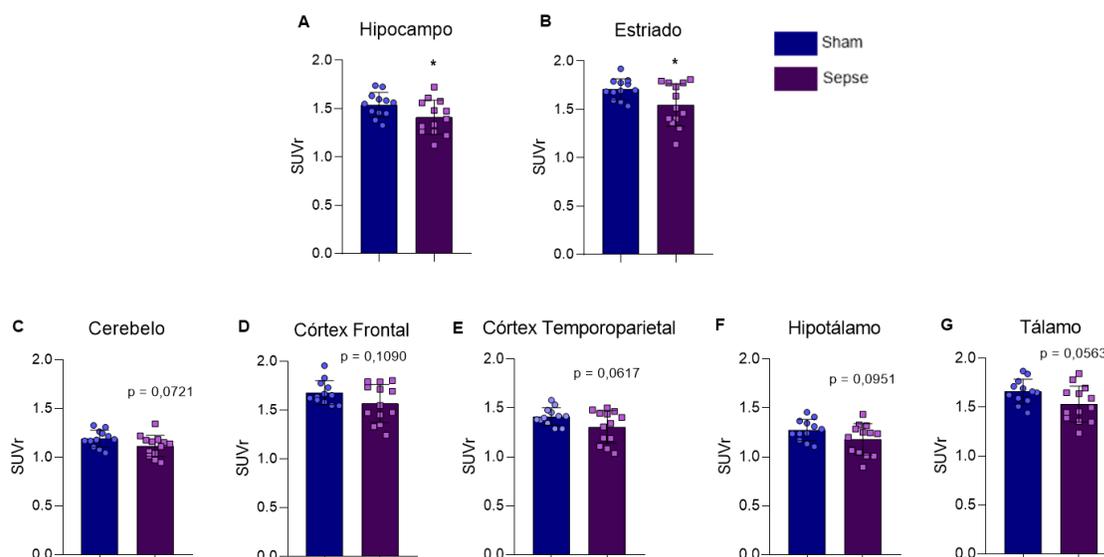


Figura 4. Quantificação da captação de [¹⁸F] FDG em hipocampo (A), estriado (B), cerebelo (C), córtex frontal (D), córtex temporoparietal (E), hipotálamo (F) e tálamo (G). Os dados foram expressos em média ± desvio padrão dos grupos (n = 12-13). * p < 0,05 (teste t).

O micro-PET [¹⁸F] FDG também foi realizado nos animais 120 dias após a indução de inflamação sistêmica. Aqui observamos as imagens de captação de PET-FDG, que também nos sugerem uma diminuição na captação de glicose nos animais que foram acometidos pela inflamação sistêmica quando comparados ao grupo sham (**Fig. 5A, B**). De fato, a quantificação da captação de [¹⁸F] FDG no

cérebro total demonstra uma diminuição na captação de glicose no grupo sepse quando comparado ao controle (**Fig. 5C**; SUVr sham = $1,33 \pm 0,09$; SUVr sepse = $1,18 \pm 0,14$; $p = 0,017$). A **Fig. 5D** apresenta o mapa de porcentagem de alteração, voxel-a-voxel, em diferentes porções cerebrais onde conseguimos observar maiores variações nas regiões hipocampais e corticais. A **Fig. 5E** apresenta o mapa t-estatístico que evidencia as regiões alteradas significativamente.

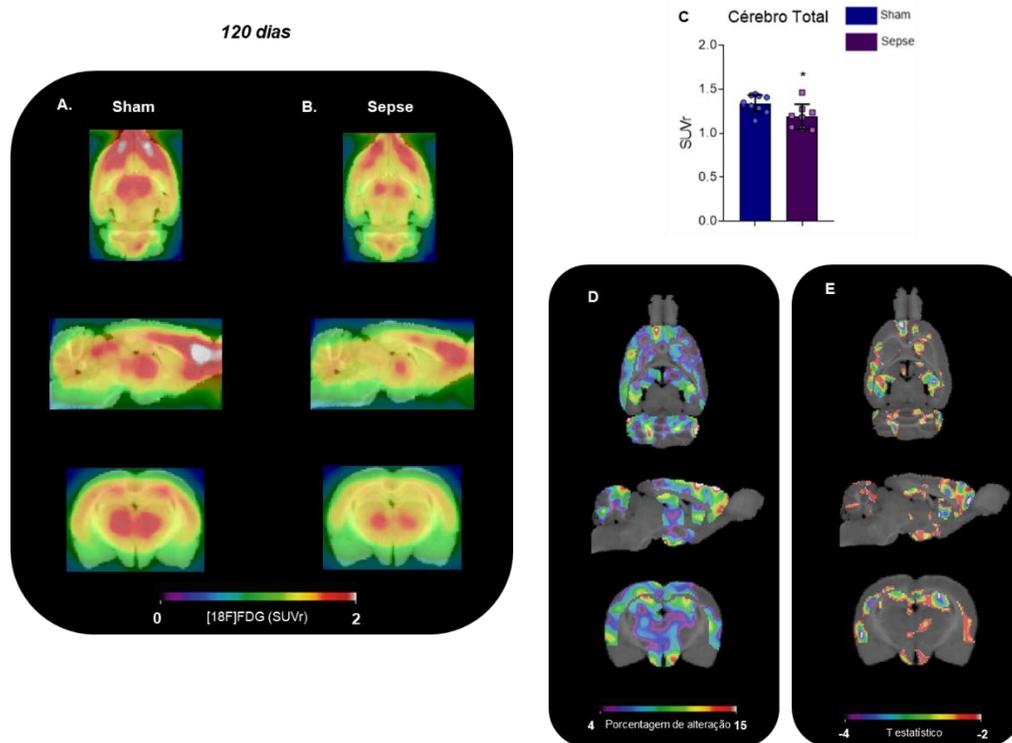


Figura 5. Captação de $[^{18}\text{F}]$ FDG no cérebro total dos animais sham (A) e sepse (B). Quantificação da captação de $[^{18}\text{F}]$ FDG no cérebro total (C). Porcentagem de alteração entre os grupos sham e sepse (D). Mapa t estatístico sobreposto a modelo histológico (E). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão dos grupos ($n = 8-10$). * $p < 0,05$ (teste t).

Avaliamos a captação de [¹⁸F] FDG das regiões de interesse individualmente e evidenciamos, no grupo sepse, um hipometabolismo no hipocampo (**Fig. 6A**; sham = 1,50 ± 0,12; sepse = 1,33 ± 0,18; p = 0,028), córtex frontal (**Fig. 6B**; sham = 1,61 ± 0,13; sepse = 1,39 ± 0,17; p = 0,0073), córtex temporoparietal (**Fig. 6C**; sham = 1,32 ± 0,09; sepse = 1,18 ± 0,11; p = 0,0097), cerebelo (**Fig. 6D**; sham = 1,21 ± 0,06; sepse = 1,10 ± 0,11; p = 0,024) e hipotálamo (**Fig. 6E**; sham = 1,29 ± 0,11; sepse = 1,13 ± 0,14; p = 0,020), quando comparados ao grupo sham. Estriado e tálamo não apresentaram alterações significativas entre os grupos (**Fig. 6F e G**).

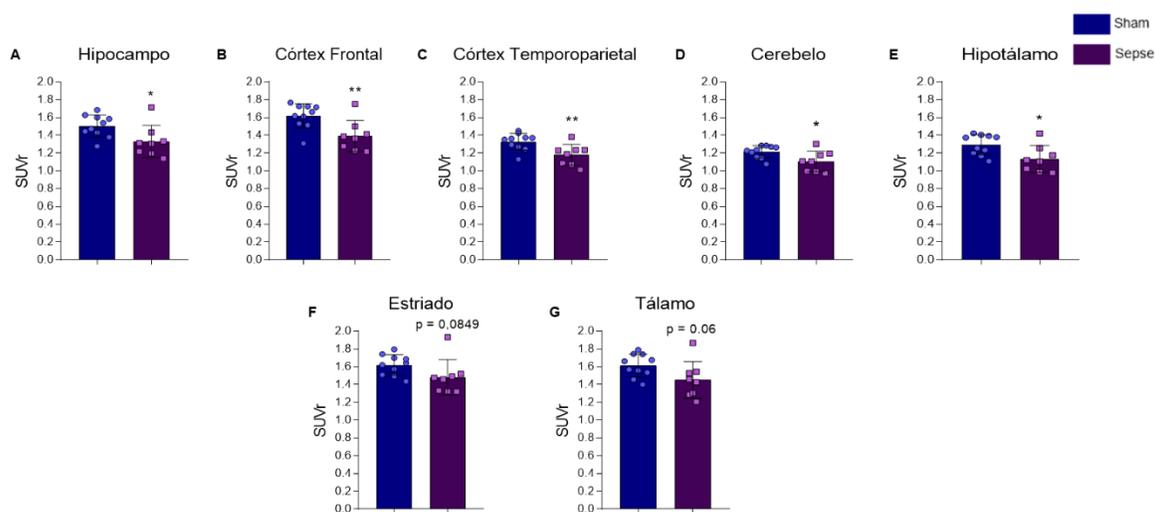


Figura 6. Quantificação da captação de [¹⁸F] FDG em hipocampo (A), córtex frontal (B), córtex temporoparietal (C), cerebelo (D), hipotálamo (E), estriado (F) e tálamo (G). Os dados foram expressos em média ± desvio padrão dos grupos (n = 12-13). * p < 0,05, ** p < 0,01 (teste t).

Posteriormente, comparamos as regiões de interesse entre os animais 30 e 120 dias após a sepse. Observamos, contudo, que não há diferença significativa, seja nas análises de região total, ou nos mapas estatísticos voxel-a-voxel, indicando

uma estabilização do metabolismo de FDG entre os 30 e 120 dias após a recuperação dos animais à sepse.

A inflamação sistêmica grave não altera o metabolismo de glutamato a longo prazo

A captação de glutamato a longo prazo foi avaliada em fatias corticais e hipocampais após um episódio de inflamação sistêmica grave. Observamos que em 30 dias após a indução da sepse, não há diferença significativa na captação de glutamato nas regiões cortical e hipocampal entre os grupos sham e sepse (**Fig. 8A**, sham = $100 \pm 35,1$; sepse = $115 \pm 39,53$; **8B**, sham = $100 \pm 17,52$; sepse = $96,49 \pm 20,69$). Com base nesses resultados, analisamos os níveis de glutamato no LCR, onde observamos também não haver diferença estatística nos níveis de glutamato 30 dias após a indução da inflamação sistêmica no grupo sepse, em relação ao sham (**Fig. 8C**; sham = $2,66 \pm 0,32 \mu\text{mol}$; sepse = $4,12 \pm 1,74 \mu\text{mol}$).

Posteriormente analisamos a quantidade presente, em tecido cerebral, de GLT-1, o principal transportador de glutamato astrocitário no SNC. Evidenciamos, no grupo sepse, uma diminuição no imunoconteúdo de GLT-1 em hipocampo, quando comparado ao grupo sham (**Fig. 8D**; sham = $100 \pm 21,63$; sepse = $34,06 \pm 21,44$; $p = 0,0002$). Contudo, a avaliação do imunoconteúdo de GLT-1 em córtex não demonstrou diferença significativa entre os grupos (**Fig. 8E**; sham = $100 \pm 15,33$; sepse = $76,65 \pm 35,23$).

30 dias

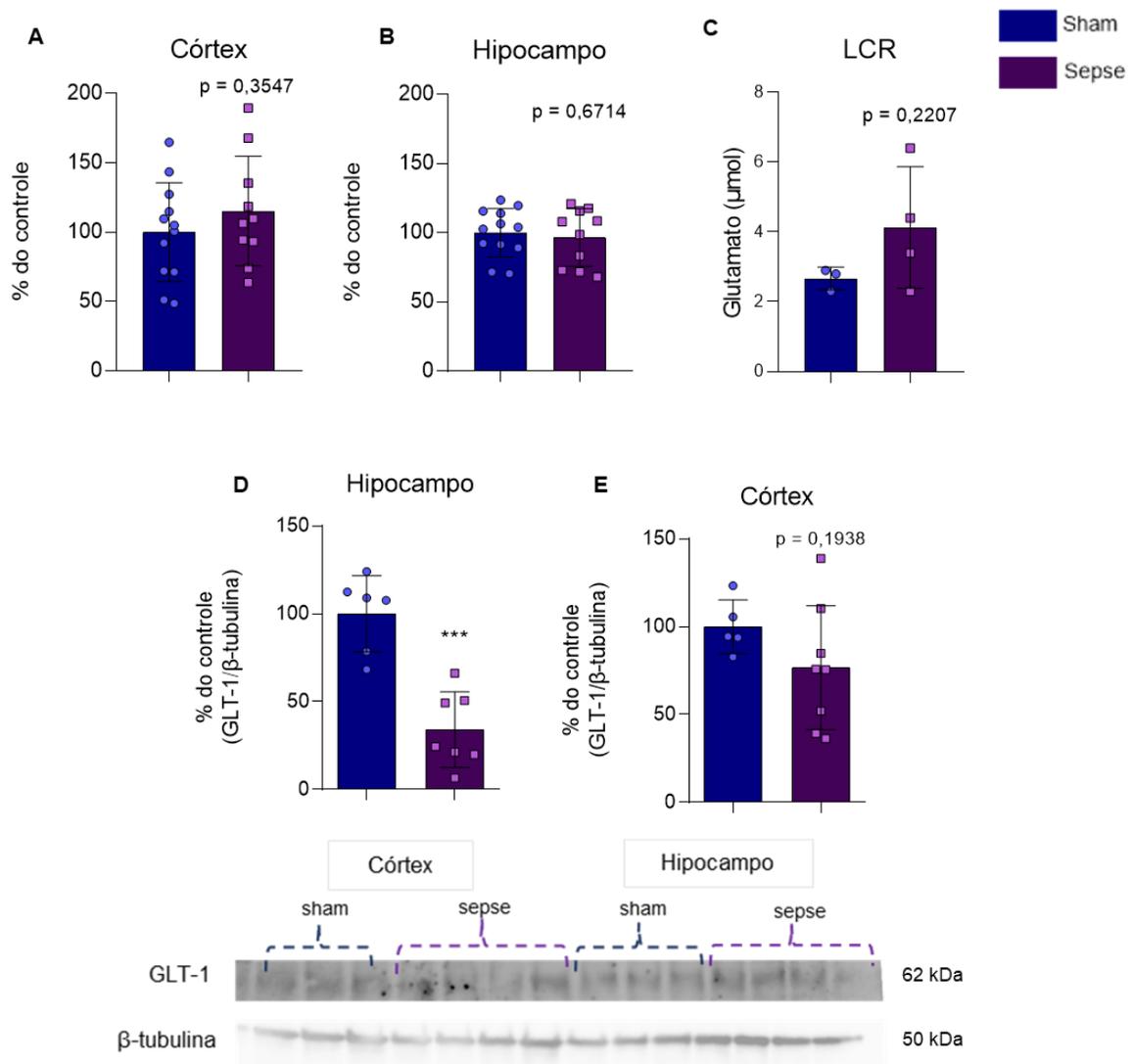


Figura 8. Captação de glutamato em fatias de córtex (A) e hipocampo (B) e níveis de glutamato no LCR (C) 30 dias após a indução à sepse. Imunoconteúdo de GLT-1 em hipocampo (D) e córtex (E) 30 dias após à sepse. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão dos grupos ($n = 3-12$). *** $p < 0,001$ (teste t).

Determinamos também a captação de glutamato em fatias de córtex e hipocampo 120 dias após a indução da sepse. Conforme observamos na **Fig. 9A e B**, tanto em hipocampo quanto em córtex não encontramos diferença estatística

entre os grupos. Após, analisamos a expressão do GLT-1 em córtex observamos um aumento da expressão do GLT-1 no grupo sepse, quando comparado ao controle (**Fig. 9C**; sham = $100 \pm 15,99$; sepse = $132,98 \pm 34,49$; $p = 0,0134$). Em hipocampo não encontramos diferença significativa entre os grupos (**Fig. 9D**).

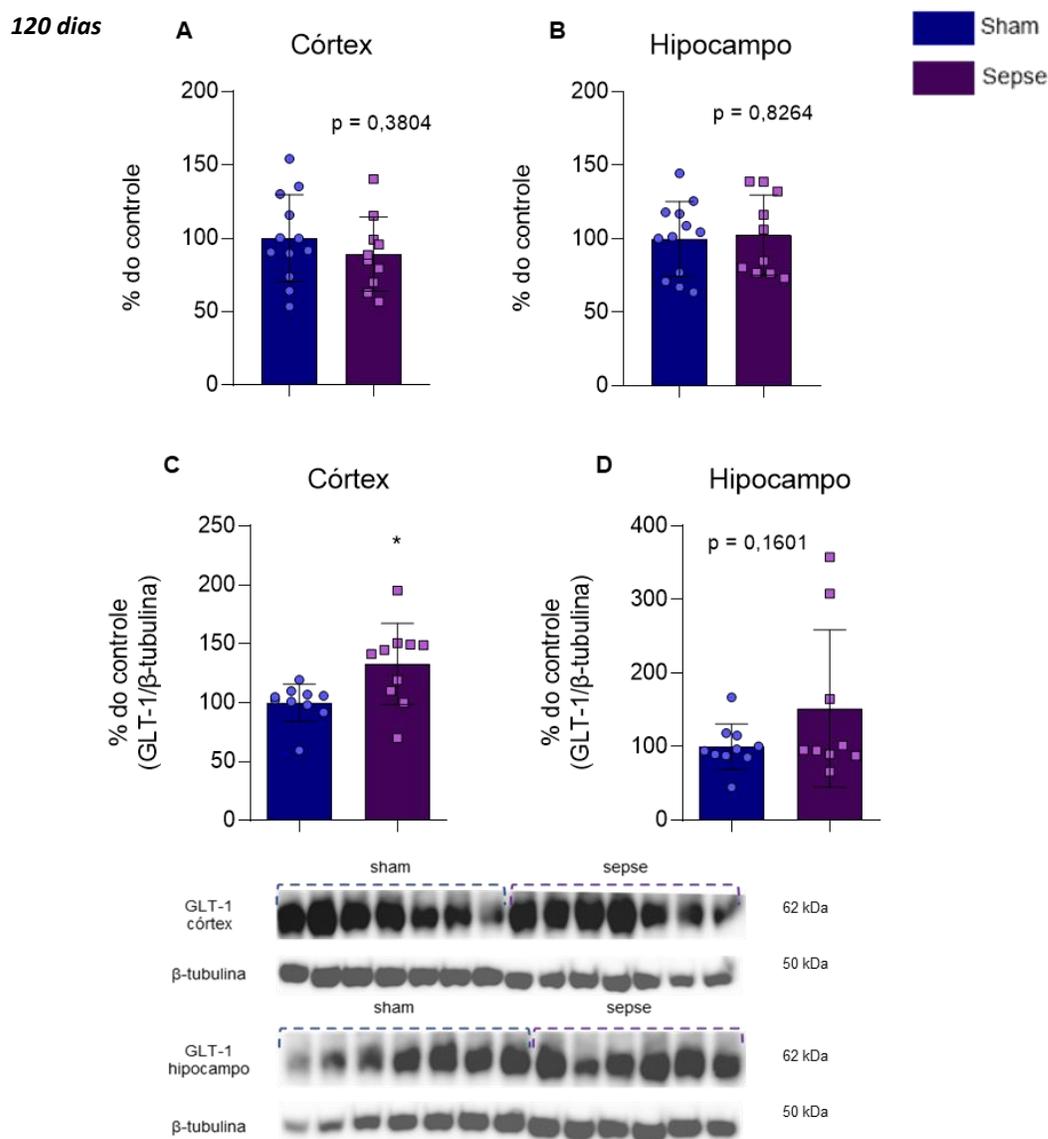


Figura 9. Captação de glutamato em fatias de córtex (A) e hipocampo (B) 120 dias após a indução à sepse. Imunoconteúdo de GLT-1 em hipocampo (C) e córtex (D) 120 dias após à sepse. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão dos grupos ($n = 10-12$). * $p < 0,05$ (teste t).

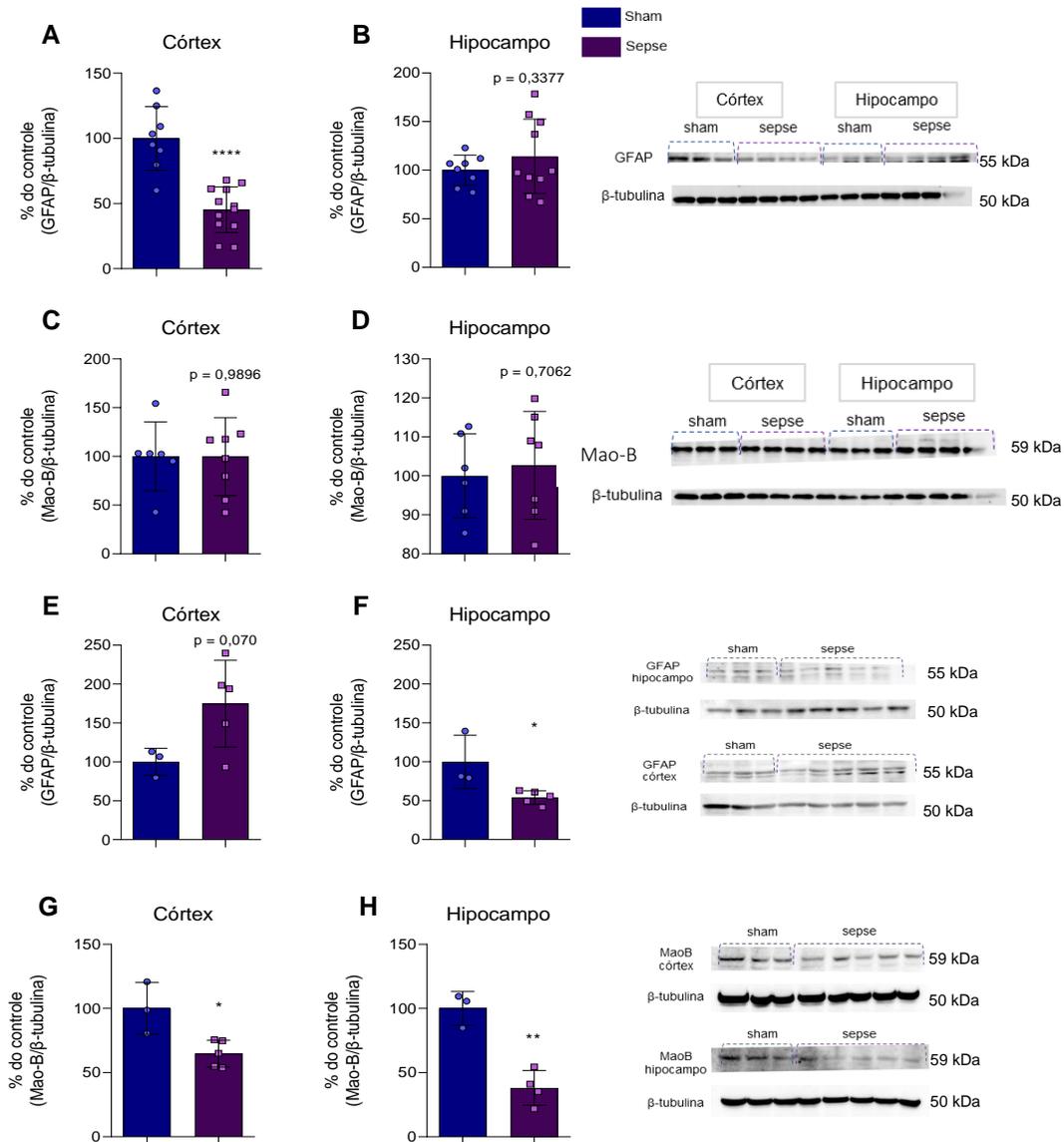
Sepse promove alterações persistentes em proteínas astrocitárias

Para determinarmos alterações astrocitárias no cérebro dos animais após a indução à inflamação sistêmica grave, analisamos duas importantes proteínas astrocitárias: GFAP e Mao-B. Observamos que 30 dias após a indução de LCP, houve uma diminuição da expressão de GFAP em córtex, quando comparado ao grupo sham (**Fig. 10A**; sham = $100 \pm 24,44$; sepse = $45,24 \pm 17,59$; $p < 0.0001$). Já na região hipocampal, não foi identificada nenhuma diferença estatística entre os grupos (**Fig. 10B**). Analisamos também a expressão da enzima Mao-B 30 dias após a sepse e, observamos que não houve alteração na sua expressão em ambos os grupos e regiões cerebrais analisadas (**Fig. 10C e D**).

Semelhante ao observado no tempo de 30 dias pós-sepse, o imunocontéudo de GFAP em hipocampo de ratos 60 dias após a recuperação da sepse apresentou-se diminuído, quando comparado ao grupo sham (**Fig. 10F**; sham = $100 \pm 34,17$; sepse = $54,10 \pm 8,72$; $p = 0,024$). Em relação ao córtex, observamos que não houve diferença estatística entre os grupos (**Fig. 10E**). Evidenciamos, também em 60 dias, uma diminuição significativa nos níveis de Mao-B, tanto em córtex (**Fig. 10G**; sham = $100 \pm 20,24$; sepse = $64,79 \pm 10,45$; $p = 0,015$) quanto em hipocampo (**Fig. 10H**; sham = $100 \pm 13,16$; sepse = $38,1 \pm 13,53$; $p = 0,018$) no grupo sepse quando comparado ao sham.

Ainda, após 120 dias da indução cirúrgica à sepse determinamos a expressão de GFAP em córtex e hipocampo dos animais, contudo não foram observadas diferenças significativas no imunocontéudo dessa proteína entre os

grupos (**Fig. 10I - J**). Em relação aos níveis de Mao-B, observamos uma diminuição na região hipocampal nos animais sepse, quando comparado ao grupo sham (**Fig.10L**; sham = $100 \pm 30,53$; sepse = $69,47 \pm 12,46$; $p = 0,0306$). Em córtex, não há diferença estatística entre os grupos (**Fig. 10K**).



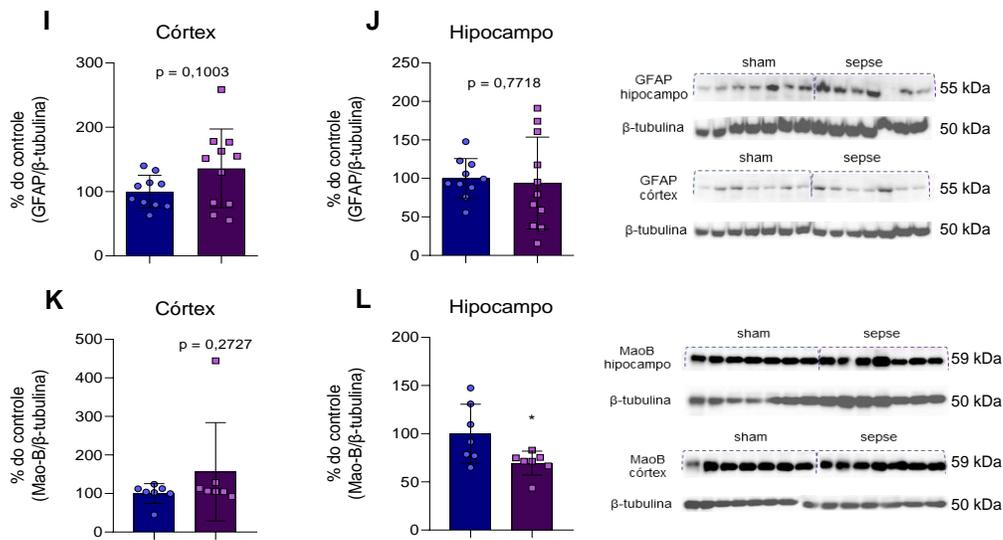


Figura 10. Imunoconteúdo GFAP em córtex (A) e hipocampo (B) e Mao-B em córtex (C) e hipocampo (D) 30 dias após indução à sepse. Imunoconteúdo de GFAP em córtex (E) e hipocampo (F) e Mao-B em córtex (G) e hipocampo (H) 60 dias após indução de sepse. Imunoconteúdo de GFAP córtex (I) e hipocampo (J) e Mao-B em córtex (K) e hipocampo (L) 120 dias após indução à inflamação sistêmica grave. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão dos grupos ($n = 3-11$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ (teste t).

DISCUSSÃO

Nesse trabalho analisamos, em modelo animal, os prejuízos metabólicos cerebrais a longo prazo promovidos pela sepse. Observamos uma disfunção gradual na memória declarativa dos animais, iniciando em 60 dias pós-sepse. Mostramos também que a sepse causa danos persistentes à BSC, que pode estar ligado tanto as alterações nas funções cognitivas, quanto ao hipometabolismo energético cerebral observado nesses animais, principalmente em regiões relacionadas à memória e aprendizado. Além disso, demonstramos alterações em proteínas astrocitárias decorrentes à inflamação sistêmica grave, evidenciando um potencial link entre prejuízo no funcionamento dessas células gliais e a patogenicidade a longo prazo promovida pela inflamação sistêmica.

Diversos estudos mostram que a indução à sepse promove um comprometimento cognitivo grave, ainda em sua fase aguda (Tuon, Comim et al. 2008, Ji, Xia et al. 2018). Nós decidimos analisar os efeitos a longo prazo na capacidade cognitiva dos animais após a indução à inflamação sistêmica grave. Observamos que 30 dias após a indução à inflamação sistêmica grave os animais submetidos à sepse registraram uma consolidação no aprendizado no teste de reconhecimento de objetos. Corroborando com nossos resultados, um estudo mostrou que nesse mesmo período pós recuperação, animais que foram submetidos à inflamação sistêmica grave por LCP não apresentaram disfunção cognitiva de reconhecimento de novos objetos (Tuon, Comim et al. 2008). Já Semmler e colaboradores demonstraram que animais induzidos a sepse, através do modelo de LPS, após 14 dias já apresentaram testes de comportamento

alterados em campo aberto e labirinto em Y, utilizado para avaliar integridade de áreas cerebrais como córtex e hipocampo, evidenciando prejuízo cognitivo (Semmler, Frisch et al. 2007).

Já em 60 e 120 dias após a intervenção cirúrgica, evidenciamos que os animais que sofreram a sepse não apresentaram diferença no tempo de exploração entre o objeto familiar e o novo, mostrando que não tiveram uma consolidação do aprendizado. Em um estudo recente, pesquisadores demonstraram que após 60 dias da indução de sepse os animais ainda apresentavam função cognitiva normal, controverso ao nosso achado. Já em 90 dias pós LCP, foi evidenciado que os animais já apresentam prejuízo no reconhecimento de novos objetos (Olivieri, Michels et al. 2018). Esse estudo corrobora com os nossos achados, demonstrando que há perda de função cognitiva progressiva nos animais após recuperação da sepse. É importante ressaltar que realizamos somente o teste de reconhecimento de objeto em nosso estudo, e que um único teste comportamental não reflete a capacidade cognitiva dos animais como um todo. Para obtermos um painel mais completo em relação a performance cognitiva, é necessária a realização de outros testes, como por exemplo teste de nado forçado, teste de labirinto em Y e, teste de esquiva inibitória, que ampliem e avaliem diferentes funções cerebrais.

O aumento da permeabilidade da BSC promovido pela resposta inflamatória severa observado na fase aguda da sepse vêm sendo implicado na fisiopatologia da EAS (Gofton and Young 2012). Estudos na fase aguda, em ratos, após 1 h de indução à sepse por infusão bacteriana, demonstram um aumento da permeabilidade da BSC devido à ativação e disfunção das células endoteliais,

astrócitos e das células microgliais que a compõem (du Moulin, Paterson et al. 1985, Obermeier, Daneman et al. 2013). Com base nesses dados, analisamos se a permeabilidade aumentada da BSC persiste por um longo período após a indução à sepse. Nossos achados revelam que 30 dias após a indução cirúrgica à sepse há um aumento significativo nos níveis de albumina no LCR dos animais sépticos que persiste pelo menos por 120 dias após a sua recuperação, ou seja, ainda há dano à BSC em animais LCP. Avaliamos também, em LCR, um aumento de celularidade nos animais LCP, ocorrendo, provavelmente pela ativação de células imunes, que liberam mediadores inflamatórios, e esses, através da circulação sanguínea chegam ao SNC contribuindo para uma disfunção neuronal, ativação de células gliais e consequente aumento da permeabilidade e rupturas na BSC, podendo causar neuroinflamação (Nwafor, Brichacek et al. 2019). Corroborando, um estudo demonstrou em paciente 90 dias após choque séptico uma persistente disfunção da BSC (Piazza, Cotena et al. 2009). Um dano persistente na BSC pode acarretar em um contato contínuo entre a periferia e o SNC, ocorrendo, por exemplo, infiltração de células como hemácias, macrófagos e leucócitos, que podem levar à aceleração do surgimento de doenças neurodegenerativas (Sweeney, Sagare et al. 2018).

Alterações a nível metabólico, principalmente nas fases iniciais da sepse, já tem sido demonstrada. Estudos recentes já demonstraram uma diminuição na captação de glicose cerebral em 12 h após indução à sepse por meio de LPS em camundongos e 24 h após a indução por LCP em ratos, ambos utilizando [¹⁸F] FDG-PET (Catarina, Luft et al. 2018, Bellaver, Rocha et al. 2019). Sabe-se também que o hipometabolismo de [¹⁸F] FDG é, atualmente, considerado um importante

marcador de disfunção sináptica, sendo associado a déficit cognitivo na doença de Alzheimer (Gardener, Sohrabi et al. 2016, Weise, Chen et al. 2018). Aqui, demonstramos um hipometabolismo de [¹⁸F] FDG *in vivo* nos animais, iniciando 30 dias após a indução cirúrgica à sepse e persistindo, em níveis similares, por pelo menos 120 dias após a recuperação de um episódio inflamatório sistêmico. Além disso, observamos um hipometabolismo em regiões como córtex, hipocampo e estriado. Corroborando, danos ao córtex e hipocampo estão associados ao prejuízo a longo prazo da capacidade de aprendizagem, e memória reduzida em modelos animais de sepse (Comim, Constantino et al. 2011). Também já se sabe que o hipocampo é uma das regiões cerebrais mais vulneráveis a danos inflamatórios e isquêmicos, como a sepse (Zhang, Wang et al. 2017).

Nosso grupo recentemente demonstrou um link entre o sinal de [¹⁸F] FDG-PET e a captação de glutamato astrocitária, sugerindo que a captação de [¹⁸F] FDG reflete, pelo menos em parte, o metabolismo de glicose astrocitário (Zimmer, Parent et al. 2017). Nesse sentido, já se sabe que os astrócitos participam diretamente da regulação do metabolismo energético cerebral. Os astrócitos promovem ligação entre o fluxo sanguíneo endotelial e os neurônios, exercendo contribuições importantes para a formação da BSC, que seletivamente, encaminha eletrólitos e nutrientes ao SNC, como por exemplo, a glicose, o combustível energético preferencial do cérebro. A glicose é captada e metabolizada pelos astrócitos e distribuída a outras células, como, por exemplo, os neurônios, para que possam desempenhar suas funções (Souza, Almeida et al. 2019). Nesse sentido, Pellerin e Magistretti propuseram um acoplamento entre o consumo de glicose astrocítico e a

geração de energia para suprimento da atividade neuronal, através da conversão da glicose à lactato que seria transportado aos neurônios (Pellerin and Magistretti 1994). Esse acoplamento parece fundamental para a potencialização de longo prazo e aquisição de memória, reforçando a importância do metabolismo de glicose astroglial para a manutenção das funções cerebrais (Suzuki, Stern et al. 2011) .

Por essa razão, avaliamos a captação de glutamato em fatias hipocampais e corticais dos animais sobreviventes à sepse. Sabe-se que a EAS afeta as células cerebrais, ocorrendo ativação tanto de astrócitos como da microglia (Gotts and Matthay 2016). A microglia ativada pode liberar grandes quantidades de glutamato, contribuindo para o processo excitatório na EAS (Mazeraud, Pascal et al. 2016). Diversos estudos têm demonstrado que altos níveis de glutamato extracelular podem levar a hiperexcitabilidade neuronal e excitotoxicidade. Essas alterações têm estado envolvidas em diversas condições patológicas, como no quadro de EAS e em doenças neurodegenerativas (Korcok, Wu et al. 2002, Michels, Steckert et al. 2015, Campbell, Muñoz-Ballester et al. 2020). Um estudo do nosso grupo demonstrou que 24 h após sepse há uma diminuição na captação de glutamato na região hipocampal, porém nosso estudo demonstra que essa alteração glutamatérgica não é persistente (Bellaver, Rocha et al. 2019). Além disso, determinamos os níveis de glutamato no LCR e não observamos acúmulo desse aminoácido 30 dias pós LCP.

Sabendo que a captação de glutamato extracelular é realizada principalmente por transportadores localizados exclusivamente em astrócitos, determinamos a expressão de GLT-1 em córtex e hipocampo. GLT-1, além de ser

o transportador mais abundante no cérebro, é o responsável por mais de 90% da captação desse neurotransmissor (Pavić, Holmes et al. 2019). Estudo realizado em animais 24 h após serem submetidos à LCP não identificou alterações na densidade de GLT-1 (Bellaver, Rocha et al. 2019). Aqui, evidenciamos 30 dias após à LCP uma diminuição de cerca de 66% no imunoconteúdo de GLT-1 em hipocampo. Já 120 dias após a indução à sepse evidenciamos um aumento de aproximadamente 33% na expressão de GLT-1 em córtex. Apesar dessas alterações nos níveis de GLT-1 terem sido observadas nas diferentes regiões cerebrais, sua atividade se manteve inalterada, tanto em 30 quanto em 120 dias, após a recuperação da sepse. Um estudo de isquemia avaliou a expressão de GLT-1, e observou uma diminuição na expressão dessa proteína na região hipocampal 6 h após o insulto, sugerindo que essa diminuição gerou neurotoxicidade induzida por glutamato (Yeh, Hwang et al. 2005). Não há outros estudos disponíveis na literatura que analisaram a expressão de GLT-1 em modelos animais de inflamação sistêmica grave a longo prazo.

O conjunto de alterações astrocitárias que ocorrem após algum tipo de injúria ou ameaça é um processo denominado reatividade astrocitária. Diversos estudos demonstram a ativação dos astrócitos durante um processo inflamatório (Pekny and Nilsson 2005, Kaur, Sharma et al. 2019). Um estudo recente feito pelo nosso grupo demonstrou que astrócitos hipocampais de animais que sofreram um insulto inflamatório severo e agudo apresentaram níveis aumentados de GFAP, demonstrando o fenótipo reativo dessas células (Bellaver, Rocha et al. 2019). Outro trabalho recente utilizando animais induzidos à sepse por LCP demonstrou que 10

dias após a indução à sepse tanto hipocampo quanto córtex apresentaram um aumento dos níveis GFAP (Catalão, Santos-Junior et al. 2020). De maneira oposta, nós observamos que após 30 dias de LCP há uma redução de cerca de 55% no imunoconteúdo de GFAP em córtex dos animais. Nos demais períodos analisados, observamos que a expressão de GFAP não apresenta diferença entre os grupos experimentais. Em hipocampo, observamos uma diminuição dos níveis de GFAP somente em 60 dias após a indução à sepse. Diferente dos nossos achados, um estudo recente identificou um aumento na expressão de GFAP em hipocampo e córtex pré-frontal 30 dias após a indução à inflamação sistêmica grave por LCP (Gasparotto, Girardi et al. 2018). Verkhatsky e colaboradores realizaram um estudo em modelo animal de doença de Alzheimer onde demonstraram, em córtex e hipocampo, diminuição geral da expressão de GFAP nos estágios iniciais da doença, sugerindo que, esses achados sejam devido ao processo de atrofia astrocitária (Verkhatsky, Rodrigues et al. 2019).

Outra alteração astrocitária que observamos foi em relação ao imunoconteúdo da enzima Mao-B. Sabe-se que a Mao-B é predominantemente expressa em astrócitos hipocámpais, e evidências *in vivo* sugerem que a sua expressão aumente durante o estágio inicial da reatividade astrocitária (Carter, Herholz et al. 2019). Nossos achados evidenciam uma diminuição do imunoconteúdo de Mao-B em hipocampo em 60 e 120 dias após a indução a inflamação sistêmica grave. Em córtex evidenciamos imunoconteúdo de Mao-B diminuído somente em 60 dias após a LCP. Diferente dos nossos achados, estudos de imagem por PET utilizando o radiotraçador ^{11}C -deuterio-L-deprenil ($[^{11}\text{C}]$ DED),

que se liga à enzima Mao-B, demonstrou um aumento da captação de [¹¹C] DED *in vivo* nos estágios iniciais da neurodegeneração e progressão de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Olsen, Aguilar et al. 2018). Sabe-se que a Mao-B apresenta em sua estrutura diferentes sítios de ligação, com isso podemos hipotetizar que o [¹¹C] DED se ligue a um sítio de ligação diferente do que o anticorpo utilizado na determinação da expressão de Mao-B no nosso estudo é capaz de detectar. Além disso, a Mao-B tem sua distribuição cerebral heterogênea, análises voxel-a-voxel como a de [¹¹C] DED-PET são capazes de detectar flutuações em sub-regiões específicas do cérebro, enquanto em nosso estudo utilizamos uma estrutura cerebral inteira (córtex ou hipocampo) para avaliar a expressão de Mao-B, e isso pode ter mascarado um possível aumento da expressão em *clusters* específicos. Além disso, outras regiões como tálamo e estriado, que são ricas em Mao-B, não foram avaliadas no nosso estudo (Tong, Meyer et al. 2013).

Essas alterações em proteínas astrocitárias podem sugerir que após a recuperação de um episódio de inflamação sistêmica grave essas células podem estar assumindo sua forma atrófica ou entrando no processo de degeneração. Ainda há poucas informações disponíveis sobre mudanças morfológicas que acompanham os processos degenerativos dos astrócitos. Porém, estudos já têm evidenciado que a atrofia dos astrócitos possa estar relacionada com o processo neurodegenerativo. Estudos de envelhecimento têm demonstrado que a perda de GLT-1 em tecido humano pode ser um reflexo do processo de atrofia astrocitária (López-Otín, Blasco et al. 2013). A atrofia dos astrócitos pode refletir a perda de

função, além de também ter sido associada a uma disfunção na BSC (Tomimoto, Akiguchi et al. 1996). Estudos já demonstram que o dano à BSC acarreta em acúmulo de material neurotóxico, proveniente da periferia, e em redução do fluxo sanguíneo podendo ativar os astrócitos, ou seja, torna-los reativos (Nelson, Sweeney et al. 2016, Sweeney, Sagare et al. 2018). Além disso, outro estudo demonstrou, em camundongos transgênicos com doença de Alzheimer, atrofia morfológica dos astrócitos através da redução de expressão de GFAP, além da diminuição do volume e número dos processos celulares (Olabarria, Noristani et al. 2010).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nessa dissertação mostram que animais sobreviventes à inflamação sistêmica grave, induzida através do modelo de LCP, apresentaram prejuízo na memória declarativa a longo prazo. Além disso, foi observado que o dano à BSC promovido pela sepse persiste mesmo após sua resolução. O estudo nesse modelo também demonstrou um hipometabolismo de glicose cerebral, a longo prazo, porém não evidenciou alterações persistentes no metabolismo glutamatérgico após LCP. E, por fim, foi observado que animais que sobrevivem a inflamação sistêmica grave apresentam alterações persistentes em proteínas astrocíticas, sugerindo que após a recuperação da inflamação grave, essas células podem estar assumindo sua forma atrófica e/ou entrando no processo de degeneração. Com esses resultados, evidenciamos que um episódio de inflamação sistêmica grave impacta, de forma duradoura, na funcionalidade cerebral e essa compreensão é importante para potenciais intervenções a fim de evitar consequências a longo prazo, como as analisadas nesse trabalho.

PERSPECTIVAS

Após a identificação inicial das alterações cerebrais persistentes que ocorrem após a indução de um episódio de inflamação sistêmica severa, temos como perspectivas: (a) ampliar as medidas de função cognitiva dos animais sobreviventes à sepse através de outros testes como nado forçado, teste de labirinto em Y, (b) ampliar o painel de proteínas astrocíticas avaliadas, a fim de melhor identificar o fenótipo astrocítico adquirido (vimentina, GLAST), (c) imunofenotipar as células presentes no LCR dos animais LCP e (d) realizar intervenções que *in vivo* possam prevenir os efeitos deletérios a longo prazo observados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, N. J., L. Ronnback and E. Hansson (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." Nat Rev Neurosci **7**(1): 41-53.
- Adam, N., S. Kandelman, J. Mantz, F. Chrétien and T. Sharshar (2013). "Sepsis-induced brain dysfunction." Expert Review of Anti-infective Therapy **11**(2): 211-221.
- Angus, D. C. and T. van der Poll (2013). "Severe Sepsis and Septic Shock." New England Journal of Medicine **369**(9): 840-851.
- Annane, D. and T. Sharshar (2015). "Cognitive decline after sepsis." Lancet Respir Med **3**(1): 61-69.
- Barichello, T., M. R. Martins, A. Reinke, L. S. Constantino, R. A. Machado, S. S. Valvassori, J. C. Moreira, J. Quevedo and F. Dal-Pizzol (2007). "Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation." Braz J Med Biol Res **40**(6): 831-837.
- Bartels, A. and S. Zeki (2005). "The chronoarchitecture of the cerebral cortex." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **360**(1456): 733-750.
- Bellaver, B., A. S. Rocha, D. G. Souza, D. T. Leffa, M. A. De Bastiani, G. Schu, P. C. Lukasewicz Ferreira, G. T. Venturin, S. Greggio, C. T. Ribeiro, J. C. da Costa, J. C. F. Moreira, D. P. Gelain, I. Torres, F. Klamt and E. R. Zimmer (2019). "Activated peripheral blood mononuclear cell mediators trigger astrocyte reactivity." Brain Behav Immun **80**: 879-888.
- Bergeron, M., J. Cadorette, M. A. Tetrault, J. F. Beaudoin, J. D. Leroux, R. Fontaine and R. Lecomte (2014). "Imaging performance of LabPET APD-based digital PET scanners for pre-clinical research." Phys Med Biol **59**(3): 661-678.
- Campbell, S. C., C. Muñoz-Ballester, L. Chaunsali, W. A. Mills, 3rd, J. H. Yang, H. Sontheimer and S. Robel (2020). "Potassium and glutamate transport is impaired in scar-forming tumor-associated astrocytes." Neurochem Int **133**: 104628.
- Carter, S. F., K. Herholz, P. Rosa-Neto, L. Pellerin, A. Nordberg and E. R. Zimmer (2019). "Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease." Trends Mol Med **25**(2): 77-95.
- Catalão, C. H. R., N. N. Santos-Junior, L. H. A. da Costa, A. O. Souza, E. C. Cárnio, A. Sebollela, L. C. Alberici and M. J. A. Rocha (2020). "Simvastatin Prevents Long-Term Cognitive Deficits in Sepsis Survivor Rats by Reducing Neuroinflammation and Neurodegeneration." Neurotox Res **38**(4): 871-886.
- Catarina, A. V., C. Luft, S. Greggio, G. T. Venturin, F. Ferreira, E. P. Marques, L. Rodrigues, K. Wartchow, M. C. Leite, C. A. Gonçalves, A. T. S. Wyse, J. C. Da Costa, J. R. De Oliveira, G. Branchini and F. B. Nunes (2018). "Fructose-1,6-bisphosphate preserves glucose metabolism integrity and reduces reactive oxygen species in the brain during experimental sepsis." Brain Res **1698**: 54-61.
- Chaudhry, N. and A. K. Duggal (2014). "Sepsis Associated Encephalopathy." Adv Med **2014**: 762320.
- Choi, D. W. (1994). "Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death." Prog Brain Res **100**: 47-51.
- Chung, H. Y., J. Wickel, F. M. Brunkhorst and C. Geis (2020). "Sepsis-Associated Encephalopathy: From Delirium to Dementia?" J Clin Med **9**(3).
- Cohen, G. (1990). "Monoamine oxidase and oxidative stress at dopaminergic synapses." J Neural Transm Suppl **32**: 229-238.
- Comim, C. M., L. S. Constantino, F. Petronilho, J. Quevedo and F. Dal-Pizzol (2011). "Aversive memory in sepsis survivor rats." J Neural Transm (Vienna) **118**(2): 213-217.
- Danbolt, N. C. (2001). "Glutamate uptake." Prog Neurobiol **65**(1): 1-105.

Davies, D. C. (2002). "Blood-brain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumours." *J Anat* **200**(6): 639-646.

De Luca, C., A. M. Colangelo, L. Alberghina and M. Papa (2018). "Neuro-Immune Hemostasis: Homeostasis and Diseases in the Central Nervous System." *Front Cell Neurosci* **12**: 459.

Doble, A. (1999). "The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy." *Pharmacol Ther* **81**(3): 163-221.

Dong, Y. and E. N. Benveniste (2001). "Immune function of astrocytes." *Glia* **36**(2): 180-190.

du Moulin, G. C., D. Paterson, J. Hedley-Whyte and S. A. Broitman (1985). "E. coli peritonitis and bacteremia cause increased blood-brain barrier permeability." *Brain Res* **340**(2): 261-268.

Eklom, J., S. S. Jossan, M. Bergström, L. Orelund, E. Walum and S. M. Aquilonius (1993). "Monoamine oxidase-B in astrocytes." *Glia* **8**(2): 122-132.

Ennaceur, A., A. Cavoy, J. C. Costa and J. Delacour (1989). "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. II: Effects of piracetam and pramiracetam." *Behav Brain Res* **33**(2): 197-207.

Escartin, C., E. Galea, A. Lakatos, J. P. O'Callaghan, G. C. Petzold, A. Serrano-Pozo, C. Steinhäuser, A. Volterra, G. Carmignoto, A. Agarwal, N. J. Allen, A. Araque, L. Barbeito, A. Barzilay, D. E. Bergles, G. Bonvento, A. M. Butt, W. T. Chen, M. Cohen-Salmon, C. Cunningham, B. Deneen, B. De Strooper, B. Díaz-Castro, C. Farina, M. Freeman, V. Gallo, J. E. Goldman, S. A. Goldman, M. Götz, A. Gutiérrez, P. G. Haydon, D. H. Heiland, E. M. Hol, M. G. Holt, M. Iino, K. V. Kastanenka, H. Kettenmann, B. S. Khakh, S. Koizumi, C. J. Lee, S. A. Liddelow, B. A. MacVicar, P. Magistretti, A. Messing, A. Mishra, A. V. Molofsky, K. K. Murai, C. M. Norris, S. Okada, S. H. R. Oliet, J. F. Oliveira, A. Panatier, V. Parpura, M. Pekna, M. Pekny, L. Pellerin, G. Perea, B. G. Pérez-Nievas, F. W. Pfrieger, K. E. Poskanzer, F. J. Quintana, R. M. Ransohoff, M. Riquelme-Perez, S. Robel, C. R. Rose, J. D. Rothstein, N. Rouach, D. H. Rowitch, A. Semyanov, S. Sirko, H. Sontheimer, R. A. Swanson, J. Vitorica, I. B. Wanner, L. B. Wood, J. Wu, B. Zheng, E. R. Zimmer, R. Zorec, M. V. Sofroniew and A. Verkhratsky (2021). "Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions." *Nat Neurosci*.

Escartin, C., O. Guillemaud and M. A. Carrillo-de Sauvage (2019). "Questions and (some) answers on reactive astrocytes." *Glia* **67**(12): 2221-2247.

Ferrari, C. C., M. C. Pott Godoy, R. Tarelli, M. Chertoff, A. M. Depino and F. J. Pitossi (2006). "Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra." *Neurobiol Dis* **24**(1): 183-193.

Fleischmann, C., A. Scherag, N. K. Adhikari, C. S. Hartog, T. Tsaganos, P. Schlattmann, D. C. Angus and K. Reinhart (2016). "Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations." *Am J Respir Crit Care Med* **193**(3): 259-272.

Fowler, J. S., N. D. Volkow, R. Cilento, G. J. Wang, C. Felder and J. Logan (1999). "Comparison of Brain Glucose Metabolism and Monoamine Oxidase B (MAO B) in Traumatic Brain Injury." *Clin Positron Imaging* **2**(2): 71-79.

Friberg, D., J. Bryant, W. Shannon and T. L. Whiteside (1994). "In vitro cytokine production by normal human peripheral blood mononuclear cells as a measure of immunocompetence or the state of activation." *Clin Diagn Lab Immunol* **1**(3): 261-268.

Garcia-Alvarez, M., P. Marik and R. Bellomo (2014). "Sepsis-associated hyperlactatemia." *Crit Care* **18**(5): 503.

Gardener, S. L., H. R. Sohrabi, K. K. Shen, S. R. Rainey-Smith, M. Weinborn, K. A. Bates, T. Shah, J. K. Foster, N. Lenzo, O. Salvado, C. Laske, S. M. Laws, K. Taddei, G. Verdile and R. N. Martins (2016). "Cerebral Glucose Metabolism is Associated with Verbal but not Visual Memory Performance in Community-Dwelling Older Adults." *J Alzheimers Dis* **52**(2): 661-672.

Gasparotto, J., C. S. Girardi, N. Somensi, C. T. Ribeiro, J. C. F. Moreira, M. Michels, B. Sonai, M. Rocha, A. V. Steckert, T. Barichello, J. Quevedo, F. Dal-Pizzol and D. P. Gelain (2018). "Receptor for advanced glycation end products mediates sepsis-triggered amyloid-beta accumulation, Tau phosphorylation, and cognitive impairment." J Biol Chem **293**(1): 226-244.

Gofton, T. E. and G. B. Young (2012). "Sepsis-associated encephalopathy." Nat Rev Neurol **8**(10): 557-566.

Gotts, J. E. and M. A. Matthay (2016). "Sepsis: pathophysiology and clinical management." BMJ **353**: i1585.

Green, R., L. K. Scott, A. Minagar and S. Conrad (2004). "Sepsis associated encephalopathy (SAE): a review." Front Biosci **9**: 1637-1641.

Holmseth, S., H. A. Scott, K. Real, K. P. Lehre, T. B. Leergaard, J. G. Bjaalie and N. C. Danbolt (2009). "The concentrations and distributions of three C-terminal variants of the GLT1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter protein in rat brain tissue suggest differential regulation." Neuroscience **162**(4): 1055-1071.

Hotchkiss, R. S., G. Monneret and D. Payen (2013). "Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy." Nat Rev Immunol **13**(12): 862-874.

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

Hughes, C. G., M. B. Patel and P. P. Pandharipande (2012). "Pathophysiology of acute brain dysfunction: what's the cause of all this confusion?" Curr Opin Crit Care **18**(5): 518-526.

Iwashyna, T. J., E. W. Ely, D. M. Smith and K. M. Langa (2010). "Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis." JAMA **304**(16): 1787-1794.

Ji, M. H., D. G. Xia, L. Y. Zhu, X. Zhu, X. Y. Zhou, J. Y. Xia and J. J. Yang (2018). "Short- and Long-Term Protective Effects of Melatonin in a Mouse Model of Sepsis-Associated Encephalopathy." Inflammation **41**(2): 515-529.

Kamer, A. R. (2010). "Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease." Neurology **74**(14): 1157; author reply 1157-1158.

Katial, R. K., D. Sachanandani, C. Pinney and M. M. Lieberman (1998). "Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent hosts." Clin Diagn Lab Immunol **5**(1): 78-81.

Kaur, D., V. Sharma and R. Deshmukh (2019). "Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease." Inflammopharmacology **27**(4): 663-677.

Kissoon, N., K. Reinhart, R. Daniels, M. F. R. Machado, R. D. Schachter and S. Finfer (2017). "Sepsis in Children: Global Implications of the World Health Assembly Resolution on Sepsis." Pediatr Crit Care Med **18**(12): e625-e627.

Komori, A., T. Abe, S. Kushimoto, H. Ogura, A. Shiraishi, D. Saitoh, S. Fujishima, T. Mayumi, T. Naito, T. Hifumi, Y. Shiino, T. A. Nakada, T. Tarui, Y. Otomo, K. Okamoto, Y. Umemura, J. Kotani, Y. Sakamoto, J. Sasaki, S. I. Shiraishi, K. Takuma, R. Tsuruta, A. Hagiwara, K. Yamakawa, T. Masuno, N. Takeyama, N. Yamashita, H. Ikeda, M. Ueyama, S. Fujimi and S. Gando (2020). "Characteristics and outcomes of bacteremia among ICU-admitted patients with severe sepsis." Sci Rep **10**(1): 2983.

Korcok, J., F. Wu, K. Tyml, R. R. Hammond and J. X. Wilson (2002). "Sepsis inhibits reduction of dehydroascorbic acid and accumulation of ascorbate in astroglial cultures: intracellular ascorbate depletion increases nitric oxide synthase induction and glutamate uptake inhibition." J Neurochem **81**(1): 185-193.

Lamar, C. D., R. A. Hurley and K. H. Taber (2011). "Sepsis-associated encephalopathy: review of the neuropsychiatric manifestations and cognitive outcome." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **23**(3): 237-241.

Langa, K. M., M. E. Chernew, M. U. Kabeto, A. R. Herzog, M. B. Ofstedal, R. J. Willis, R. B. Wallace, L. M. Mucha, W. L. Straus and A. M. Fendrick (2001). "National estimates of the quantity and cost of informal caregiving for the elderly with dementia." *J Gen Intern Med* **16**(11): 770-778.

Lim, C., M. P. Alexander, G. LaFleche, D. M. Schnyer and M. Verfaellie (2004). "The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest." *Neurology* **63**(10): 1774-1778.

Lobo, S. M., E. Rezende, C. L. Mendes and M. C. Oliveira (2019). "Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: the Brazilian ICUs project." *Rev Bras Ter Intensiva* **31**(1): 1-4.

López-Otín, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano and G. Kroemer (2013). "The hallmarks of aging." *Cell* **153**(6): 1194-1217.

Machado, F. R., A. B. Cavalcanti, F. A. Bozza, E. M. Ferreira, F. S. Angotti Carrara, J. L. Sousa, N. Caixeta, R. Salomao, D. C. Angus and L. C. Pontes Azevedo (2017). "The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study." *Lancet Infect Dis* **17**(11): 1180-1189.

Mazeraud, A., Q. Pascal, F. Verdonk, N. Heming, F. Chretien and T. Sharshar (2016). "Neuroanatomy and Physiology of Brain Dysfunction in Sepsis." *Clin Chest Med* **37**(2): 333-345.

Meldrum, B. S. (2000). "Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology." *J Nutr* **130**(4S Suppl): 1007s-1015s.

Michels, M., A. V. Steckert, J. Quevedo, T. Barichello and F. Dal-Pizzol (2015). "Mechanisms of long-term cognitive dysfunction of sepsis: from blood-borne leukocytes to glial cells." *Intensive Care Med Exp* **3**(1): 30.

Middeldorp, J. and E. M. Hol (2011). "GFAP in health and disease." *Prog Neurobiol* **93**(3): 421-443.

Mostel, Z., A. Perl, M. Marck, S. F. Mehdi, B. Lowell, S. Bathija, R. Santosh, V. A. Pavlov, S. S. Chavan and J. Roth (2019). "Post-sepsis syndrome - an evolving entity that afflicts survivors of sepsis." *Mol Med* **26**(1): 6.

Nelson, A. R., M. D. Sweeney, A. P. Sagare and B. V. Zlokovic (2016). "Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* **1862**(5): 887-900.

Nwafor, D. C., A. L. Brichacek, A. S. Mohammad, J. Griffith, B. P. Lucke-Wold, S. A. Benkovic, W. J. Geldenhuys, P. R. Lockman and C. M. Brown (2019). "Targeting the Blood-Brain Barrier to Prevent Sepsis-Associated Cognitive Impairment." *J Cent Nerv Syst Dis* **11**: 1179573519840652.

Obermeier, B., R. Daneman and R. M. Ransohoff (2013). "Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier." *Nat Med* **19**(12): 1584-1596.

Olabarria, M., H. N. Noristani, A. Verkhratsky and J. J. Rodríguez (2010). "Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease." *Glia* **58**(7): 831-838.

Olivieri, R., M. Michels, B. Pescador, P. Ávila, M. Abatti, L. Cucker, H. Burger, D. Dominguni, J. Quevedo and F. Dal-Pizzol (2018). "The additive effect of aging on sepsis-induced cognitive impairment and neuroinflammation." *J Neuroimmunol* **314**: 1-7.

Olsen, M., X. Aguilar, D. Sehlin, X. T. Fang, G. Antoni, A. Erlandsson and S. Syvänen (2018). "Astroglial Responses to Amyloid-Beta Progression in a Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Mol Imaging Biol* **20**(4): 605-614.

Opitz, B. (2014). "Memory function and the hippocampus." *Front Neurol Neurosci* **34**: 51-59.

Ozawa, S., H. Kamiya and K. Tsuzuki (1998). "Glutamate receptors in the mammalian central nervous system." *Prog Neurobiol* **54**(5): 581-618.

Pavić, A., A. O. M. Holmes, V. L. G. Postis and A. Goldman (2019). "Glutamate transporters: a broad review of the most recent archaeal and human structures." *Biochem Soc Trans* **47**(4): 1197-1207.

Pekny, M. and M. Nilsson (2005). "Astrocyte activation and reactive gliosis." *Glia* **50**(4): 427-434.

Pellerin, L. and P. J. Magistretti (1994). "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10625-10629.

Piazza, O., S. Cotena, E. De Robertis, F. Caranci and R. Tufano (2009). "Sepsis associated encephalopathy studied by MRI and cerebral spinal fluid S100B measurement." Neurochem Res **34**(7): 1289-1292.

Prescott, H. C. and D. C. Angus (2018). "Enhancing Recovery From Sepsis: A Review." JAMA **319**(1): 62-75.

Prescott, H. C., K. M. Langa, V. Liu, G. J. Escobar and T. J. Iwashyna (2014). "Increased 1-year healthcare use in survivors of severe sepsis." Am J Respir Crit Care Med **190**(1): 62-69.

Ransohoff, R. M., D. Schafer, A. Vincent, N. E. Blachere and A. Bar-Or (2015). "Neuroinflammation: Ways in Which the Immune System Affects the Brain." Neurotherapeutics **12**(4): 896-909.

Semmler, A., C. Frisch, T. Debeir, M. Ramanathan, T. Okulla, T. Klockgether and M. T. Heneka (2007). "Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model." Exp Neurol **204**(2): 733-740.

Semmler, A., C. N. Widmann, T. Okulla, H. Urbach, M. Kaiser, G. Widman, F. Mormann, J. Weide, K. Fliessbach, A. Hoeft, F. Jessen, C. Putensen and M. T. Heneka (2013). "Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors." J Neurol Neurosurg Psychiatry **84**(1): 62-69.

Shulyatnikova, T. and A. Verkhratsky (2020). "Astroglia in Sepsis Associated Encephalopathy." Neurochem Res **45**(1): 83-99.

Singer, M., C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J. D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J. L. Vincent and D. C. Angus (2016). "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)." JAMA **315**(8): 801-810.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.

Souza, D. G., R. F. Almeida, D. O. Souza and E. R. Zimmer (2019). "The astrocyte biochemistry." Semin Cell Dev Biol **95**: 142-150.

Suzuki, A., S. A. Stern, O. Bozdagi, G. W. Huntley, R. H. Walker, P. J. Magistretti and C. M. Alberini (2011). "Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation." Cell **144**(5): 810-823.

Sweeney, M. D., A. P. Sagare and B. V. Zlokovic (2018). "Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders." Nat Rev Neurol **14**(3): 133-150.

Tanaka, K. (2000). "Functions of glutamate transporters in the brain." Neurosci Res **37**(1): 15-19.

Tomimoto, H., I. Akiguchi, T. Suenaga, M. Nishimura, H. Wakita, S. Nakamura and J. Kimura (1996). "Alterations of the blood-brain barrier and glial cells in white-matter lesions in cerebrovascular and Alzheimer's disease patients." Stroke **27**(11): 2069-2074.

Tong, J., J. H. Meyer, Y. Furukawa, I. Boileau, L. J. Chang, A. A. Wilson, S. Houle and S. J. Kish (2013). "Distribution of monoamine oxidase proteins in human brain: implications for brain imaging studies." J Cereb Blood Flow Metab **33**(6): 863-871.

Tumani, H., A. Huss and F. Bachhuber (2017). "The cerebrospinal fluid and barriers - anatomic and physiologic considerations." Handb Clin Neurol **146**: 21-32.

Tuon, L., C. M. Comim, F. Petronilho, T. Barichello, I. Izquierdo, J. Quevedo and F. Dal-Pizzol (2008). "Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats." Intensive Care Med **34**(9): 1724-1731.

Vandenberg, R. J. and R. M. Ryan (2013). "Mechanisms of glutamate transport." Physiol Rev **93**(4): 1621-1657.

Verkhatsky, A., J. J. Rodrigues, A. Pivoriunas, R. Zorec and A. Semyanov (2019). "Astroglial atrophy in Alzheimer's disease." Pflugers Arch **471**(10): 1247-1261.

Weise, C. M., K. Chen, Y. Chen, X. Kuang, C. R. Savage and E. M. Reiman (2018). "Left lateralized cerebral glucose metabolism declines in amyloid- β positive persons with mild cognitive impairment." Neuroimage Clin **20**: 286-296.

Widmann, C. N. and M. T. Heneka (2014). "Long-term cerebral consequences of sepsis." Lancet Neurol **13**(6): 630-636.

Yeh, T. H., H. M. Hwang, J. J. Chen, T. Wu, A. H. Li and H. L. Wang (2005). "Glutamate transporter function of rat hippocampal astrocytes is impaired following the global ischemia." Neurobiol Dis **18**(3): 476-483.

Zanirati, G., P. N. Azevedo, G. T. Venturin, S. Greggio, A. M. Alcará, E. R. Zimmer, P. K. Feltes and J. C. DaCosta (2018). "Depression comorbidity in epileptic rats is related to brain glucose hypometabolism and hypersynchronicity in the metabolic network architecture." Epilepsia **59**(5): 923-934.

Zhang, S., X. Wang, S. Ai, W. Ouyang, Y. Le and J. Tong (2017). "Sepsis-induced selective loss of NMDA receptors modulates hippocampal neuropathology in surviving septic mice." PLoS One **12**(11): e0188273.

Zimmer, E. R., M. J. Parent, D. G. Souza, A. Leuzy, C. Lecrux, H. I. Kim, S. Gauthier, L. Pellerin, E. Hamel and P. Rosa-Neto (2017). "[¹⁸F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport." Nat Neurosci **20**(3): 393-395.