

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

PPG CBIOL

Dissertação

Efeito da doxiciclina na melhora cognitiva de animais com sepse polimicrobiana: papel da metaloproteinase cerebral na regulação das vias neuro inflamatórias e oxidativas

Maria Laura da Cruz Castro

Ouro Preto

2023



UFOP

Maria Laura da Cruz Castro

Efeito da doxiciclina na melhora cognitiva de animais com sepse polimicrobiana: papel da metaloproteinase cerebral na regulação das vias neuro inflamatórias e oxidativas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas como parte das exigências para obtenção do grau de Mestre na área de Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa

Coorientador: Dr. Allan Jefferson Cruz Calsavara

Ouro Preto

2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C355e Castro, Maria Laura da Cruz.
Efeito da doxícilina na melhora cognitiva de animais com sepse polimicrobiana [manuscrito]: papel da metaloproteinase cerebral na regulação das vias neuro inflamatórias e oxidativas. / Maria Laura da Cruz Castro. - 2023.
99 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa.

Coorientador: Prof. Dr. Allan Jefferson Cruz Calsavara.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Bioquímica. 2. Septicemia. 3. Cognição. 4. Estresse oxidativo. 5. Camundongos C57BL/6. I. Costa, Daniela Caldeira. II. Calsavara, Allan Jefferson Cruz. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 577.122

Bibliotecário(a) Responsável: Sione Galvão Rodrigues - CRB6 / 2526



FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Laura da Cruz Castro

Efeito da doxiciclina na melhora cognitiva de animais com sepse polimicrobiana: papel da metaloproteinase cerebral na regulação das vias neuroinflamatórias e oxidativas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre

Aprovada em 02 de fevereiro de 2023

Membros da banca

Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dr. Allan Jefferson Cruz Calsavara - Co-orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra Tatiana Barichello - University of Texas
Dr. Orlando David Henrique dos Santos - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Sílvia de Paula Gomes - Universidade Federal de Ouro Preto

Daniela Caldeira Costa Calsavara, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 14/02/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Caldeira Costa Calsavara, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/02/2023, às 21:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0475342** e o código CRC **7C3D42DE**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe e ao meu pai por sempre me apoiarem e não medirem esforços para me ajudarem em qualquer coisa que eu precisasse. Aos meus irmãos Danilo e Guilherme pelo apoio e pela amizade.

Às amigas da República Peça Rara por me acolherem nesse período. Obrigada pelo companheirismo, risadas, cafés, festas. Com certeza fizeram os meus dias muito mais leves em Ouro Preto.

A minha orientadora Daniela pela oportunidade, pelo apoio, paciência, conhecimentos passados e dedicação com todos os seus alunos.

Ao meu coorientador Allan Calsavara pela orientação e disponibilidade sempre que precisei.

A toda equipe do Laboratório de Bioquímica Metabólica pelo apoio e companheirismo, em especial a Flávia que me auxiliou em todas as etapas do mestrado.

A técnica do LBM, Renata Rebeca, que me auxiliou na padronização da técnica de oxyblot e em outros experimentos.

A Jéssica, e equipe do laboratório Fiocruz DATA que cederam sua estrutura para a realização da extração de RNA e síntese do cDNA e a empresa *Loccus* por fornecer os kits e equipamento para a extração de RNA.

A aluna de iniciação científica Gabrielly Guimarães Coutinho e ao Prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga do DEFAR-UFOP que orientaram os experimentos de modelagem molecular.

Aos colegas da pós-graduação e aos laboratórios parceiros: Laboratório de Biologia e Tecnologia de micro-organismos, Laboratório de Nutrição Experimental, Laboratório de Imunopatologia, Laboratório de Imunobiologia da Inflamação, Laboratório Multiusuário de Pesquisa em Bioquímica Nutricional e Biologia Molecular - ENUT/UFOP e o Centro de Ciência Animal (CCA).

A Universidade Federal de Ouro Preto, ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e as agências de fomento CAPES e CNPq que possibilitaram a realização desse trabalho.

A todos, que mesmo indiretamente, contribuíram de alguma forma com esse trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Indivíduos que sobrevivem à sepse podem apresentar sequelas neurológicas com diminuição da função cognitiva. Um dos mecanismos responsáveis por esta diminuição da função cognitiva é o aumento da atividade das metaloproteinases da matriz (MMPs). A doxiciclina é um antibiótico da classe das tetraciclinas e um potente inibidor de MMPs. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da doxiciclina (um inibidor de MMPs) na possível melhora cognitiva de camundongos com sepse polimicrobiana e os seus mecanismos subjacentes. Foram utilizados 183 camundongos isogênicos C57BL/6 machos, com 8 a 12 semanas de idade distribuídos em cinco grupos: Grupo 1: animais submetidos à cirurgia branca e tratados com soro fisiológico 0,9% (SHAM) (n=27); Grupo 2: animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e tratados com soro fisiológico 0,9% (n=49); Grupo 3: CLP tratados com doxiciclina (20 mg/kg/dia) (DOX20) (n=38); Grupo 4: CLP tratados com doxiciclina (40 mg/kg/dia) (DOX40) (n=32); Grupo 5: CLP tratados com ceftriaxona (400 mg/kg/dia) (CTX) (n=37). Os tratamentos foram realizados por meio de uma injeção subcutânea diária durante o período de cinco dias. No quarto dia de tratamento os animais foram submetidos aos testes cognitivos. O tratamento com a doxiciclina foi capaz de reduzir os níveis de TNF e VEGF no córtex cerebral, inibir MMP-9, melhorar o perfil redox, por meio do aumento da atividade de SOD e catalase e diminuição do dano oxidativo lipídico, além de aumentar os níveis de BDNF no hipocampo e melhorar a cognição dos animais. Além disso, a doxiciclina interagiu de maneira mais efetiva com a MMP-9 do que a ceftriaxona no estudo de modelagem molecular. Portanto, nossos resultados sugerem que a doxiciclina por meio da sua capacidade de inibir MMPs e dos seus mecanismos imunomoduladores e antioxidantes é um potencial fármaco para o tratamento do déficit cognitivo em indivíduos que sobrevivem à sepse.

Palavras-chave: Sepse; Doxiciclina; Cognição; Neuroinflamação; Estresse oxidativo; Camundongos C57BL/6; Ceftriaxona.

ABSTRACT

Individuals who survive sepsis may have neurological sequelae with decreased cognitive function. One of the mechanisms responsible for this decrease in cognitive function is the increased activity of matrix metalloproteinases (MMPs). Doxycycline is an antibiotic of the tetracycline class and a potent inhibitor of MMPs. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of doxycycline on the possible cognitive improvement of mice with polymicrobial sepsis and its underlying mechanisms. 183 isogenic male C57BL/6 mice, aged 8 to 12 weeks, were divided into five groups: Group 1: animals submitted to white surgery and treated with 0.9% saline (SHAM) (n=27); Group 2: animals submitted to cecum ligation and puncture surgery (CLP) and treated with 0.9% saline (n=49); Group 3: CLP treated with doxycycline (20 mg/kg/day) (DOX20) (n=38); Group 4: CLP treated with doxycycline (40 mg/kg/day) (DOX40) (n=32); Group 5: CLP treated with ceftriaxone (400 mg/kg/day) (CTX) (n=37). The treatments were carried out through a daily subcutaneous injection for 05 days. On the 4th day of treatment, the animals were submitted to cognitive tests. Treatment with doxycycline was able to reduce TNF and VEGF levels and MMP-9 activity in the cerebral cortex, improve the redox profile by increasing SOD and catalase activity and decreasing lipid oxidative damage, increase BDNF levels in the hippocampus, and improve cognition in the animals. Furthermore, doxycycline interacted more effectively with MMP-9 than ceftriaxone in the molecular modeling study. Therefore, our results suggest that doxycycline, through its ability to inhibit MMPs and its immunomodulatory and antioxidant mechanisms, is a potential drug for the treatment of cognitive deficit in individuals who survive sepsis.

Keywords: Sepsis; Doxycycline; Cognition; Neuroinflammation; Oxidative stress; C57BL/6 mice; Ceftriaxone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Escore SOFA	16
Figura 2 – Definição de Sepsis	17
Figura 3 – Estrutura da BHE	23
Figura 4 - Estrutura das MMPs.....	24
Figura 5 – Possíveis mecanismos relacionados à neuroinflamação	27
Figura 6 - Estrutura molecular da doxiciclina na forma (A) monohidratado , (B) cloridrato e (C) hclato	32
Figura 7 - Hipótese do efeito da doxiciclina na melhora cognitiva dos animais sépticos	34
Figura 8 - Distribuição dos grupos experimentais	39
Figura 9 - Delineamento Experimental	40
Figura 10 - Camundongo após duas horas da aplicação do corante azul de evans.....	43
Figura 11 – Pose predita pelo docking da doxiciclina (-1)	53
Figura 12 - Pose predita pelo docking da doxiciclina (+1)	54
Figura 13 - Pose predita pelo docking da ceftriaxona	55
Figura 14 - Estabilidade do sistema durante a fase de equilíbrio	56
Figura 15 - RMSD dos ligantes e distâncias atômicas entre oxigênios dos ligantes e o zinco catalítico.....	58
Figura 16 - Mapa de interações gerado pelo PyContact entre a MMP-9 e a doxiciclina (-1)	59
Figura 17 - Mapa de interações gerado pelo PyContact entre a MMP-9 e a ceftriaxona.....	60
Figura 18 - Curva de sobrevivência dos grupos experimentais durante o período de tratamento	61
Figura 19 - Avaliação das citocinas imunomodulatórias na sepsis e dos tratamentos com doxiciclina e ceftriaxona.....	62
Figura 20 - Avaliação da atividade da MMP9 na sepsis e dos tratamentos com doxiciclina e ceftriaxona	63
Figura 21 - Avaliação da permeabilidade da BHE na sepsis e nos tratamentos com doxiciclina e ceftriaxona.....	64
Figura 22 - Avaliação da expressão gênica das proteínas de junção apertada na sepsis e dos tratamentos com doxiciclina e ceftriaxona	65

Figura 23 - Avaliação dos mediadores inflamatórios na sepse e o efeito dos tratamentos com doxiciclina e ceftriaxona.....	66
Figura 24 - Avaliação do perfil redox cerebral na sepse e no tratamento com doxiciclina e ceftriaxona	68
Figura 25 - Avaliação dos níveis de BDNF hipocampal na sepse e seu efeito nos tratamentos com doxiciclina e ceftriaxona	69
Figura 26 - Análise das funções cognitivas e comportamentais na sepse e no tratamento com doxiciclina e ceftriaxona	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
- BHE - Barreira hematoencefálica
- CLDN1 - Claudina 1
- CLDN5 - Claudina 5
- CLP - Cirurgia de ligadura e perfuração do ceco
- CLRs - Receptores lectina tipo C
- CREB - Proteína de ligação do elemento de resposta ao cAMP
- CTE - Cadeia transportadora de elétrons
- CTX - Ceftriaxona
- DAMPs - Padrões moleculares associados a danos endógenos
- DOX - Doxiciclina
- EAS - Encefalopatia associada à sepse
- ERNs - Espécies reativas de nitrogênio
- EROs - Espécies reativas de oxigênio
- FDA - Food and Drug Administration
- GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- HLA-DR - Isotipo DR do antígeno leucocitário humano
- IKK - I κ B quinase
- LPS - lipopolissacarídeo
- MAPK - Proteína quinase ativada por Ras/mitógeno
- MMPs - Metaloproteinases da matriz.
- NF- κ B - Fator de transcrição nuclear kappa B
- NLRP3 - Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos, repetição rica em leucina e proteína 3 contendo domínio de pirina
- NLRs - Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos e família de genes contendo repetição rica em leucina
- NO - Óxido nítrico
- NVU - Unidade neurovascular
- OCLN - Ocludina
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- p75 NTR - Receptor da neurotrofina p75

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos derivados de microrganismos

PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões

RLRs - Receptores de gene induzível por ácido retinóico

SHAM - Cirurgia branca

SNC - Sistema nervoso central

SOD - Superóxido dismutase

SOFA - *Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment*

TLRs - Receptores Toll-like

TNF - Fator de necrose tumoral

TrkB - Receptor da tropomiosina quinase B

UTI - Unidade de terapia intensiva

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

ZO-1 - Zona ocludens 1

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Sepses	16
2.1.1 Definição e epidemiologia	16
2.1.2 Modelos de sepses em roedores	19
2.1.3 Fisiopatologia da sepses	20
2.2 Fisiopatologia da sepses no cérebro	22
2.2.1 Disfunção da BHE	23
2.2.1.1 Metaloproteinases de matriz	24
2.2.2 Neuroinflamação	25
2.2.3 Estresse oxidativo	27
2.3 Alterações cognitivas na sepses e BDNF	29
2.4 Doxíciclina	31
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
3.2.1 Ensaios <i>in silico</i>	35
3.2.2 Ensaios <i>in vivo</i>	35
4 METODOLOGIA	36
4.1 Docking e Dinâmica Molecular	36
4.1.1 Docking Molecular	36
4.1.2 Dinâmica molecular	37
4.2 Animais e delineamento experimental	38
4.3 Procedimento cirúrgico CLP e SHAM	40
4.4 Dosagem de citocinas	41
4.5 Zimografia	41
4.6 Azul de evans	42
4.7 Avaliação da expressão gênica	43
4.7.1 Oligonucleotídeos iniciadores (primers)	43
4.7.2 Extração do RNA	44
4.7.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)	45
4.7.4 Reação da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	45
4.8 Determinação do perfil redox	45
4.8.1 Atividade da superóxido dismutase	46
4.8.2 Atividade da Catalase	46
4.8.3 Dosagem de TBARS	47

4.8.4 Proteína carbonilada	47
4.8.5 Oxyblot	48
4.9 Dosagem de BDNF	49
4.10 Teste de reconhecimento de novo objeto	50
4.11 Teste labirinto em Y	50
4.12 Teste campo aberto	51
4.13 Análise estatística	51
5 RESULTADOS	52
5.1 Docking e Dinâmica Molecular	52
5.1.1 Docking molecular	52
5.1.2 Dinâmica Molecular	55
5.2 Análise da taxa de sobrevivência dos animais	60
5.3 Dosagem das citocinas séricas	61
5.4 Avaliação da integridade da BHE	62
5.4.1 Atividade da MMP-9	62
5.4.2 Azul de evans	63
5.4.3 Expressão gênica das proteínas da junção apertada	64
5.5 Avaliação da neuroinflamação	66
5.6 Avaliação do perfil redox	67
5.7 Avaliação dos níveis de BDNF no hipocampo	69
5.8 Análise das funções cognitivas e comportamentais	69
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

A sepse é definida como uma disfunção orgânica provocada por uma desregulação da resposta imune do hospedeiro durante a infecção (SINGER et al., 2016). Ela é considerada uma ameaça à saúde global pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e afeta milhões de pessoas todos os anos (REINHART et al., 2017). Foram registrados em 2017 em todo o mundo cerca de 48,9 milhões de casos incidentes de sepse e foram relatadas 11,0 milhões de mortes associadas à sepse, o que constitui 19,7% de todas as mortes globais (RUDD et al., 2020). Estudos mostram que por ano cerca de 15 a 17 milhões de pacientes desenvolvem sepse, o que levou a mais de 5 milhões de mortes anualmente (LOBO et al., 2019). No Brasil estima-se que ocorrem mais de 200.000 óbitos por ano em pacientes adultos (MACHADO et al., 2017). Altos custos também estão associados à internação na sepse. Estima-se que no Brasil gasta-se em torno de US\$ 9,6 mil por paciente (SOGAYAR et al., 2008; INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE SEPSE, 2015).

Além da alta mortalidade e custos associados provocados pela sepse, o aumento da resposta inflamatória pode gerar danos em vários órgãos, inclusive no sistema nervoso central (SNC). Estudos mostram que a resposta imune exacerbada pode aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), podendo levar a sequelas neurológicas em longo prazo e diminuição da função cognitiva em pessoas que sobrevivem a sepse (BARICHELLO et al., 2019).

Um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da permeabilidade da BHE na sepse é o aumento na atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs são uma família de enzimas proteolíticas zinco-dependentes que participam de processos fisiológicos normais, como morfogênese tecidual, migração celular e angiogênese. Elas são produzidas e secretadas na matriz extracelular em sua forma inativa e em condições fisiológicas são ativadas por outras MMPs ou por proteases. Em condições patológicas podem ser reguladas por espécies reativas de oxigênio (EROs) e citocinas (DAL-PIZZOL et al., 2010; REMPE; HARTZ; BAUER, 2016; ROSENBERG, 2009).

As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são as MMPs mais estudadas no cérebro (ROSENBERG, 2009). Evidências mostram que as gelatinases são capazes de degradar as membranas basais, devido à especificidade com seus substratos, como colágeno tipo IV, fibronectina e laminina, uma vez que esses são os integrantes principais da lâmina basal que se situa ao redor dos vasos cerebrais (YANG et al., 2019). Assim, alterações nas MMPs podem levar a danos na BHE, por meio da degradação da membrana basal vascular e das proteínas de junção (YANG et al., 2022), o que poderá contribuir para respostas neuroinflamatórias (CANDELARIO-JALIL; YANG; ROSENBERG, 2009) e um desequilíbrio na homeostase cerebral (REMPE; HARTZ; BAUER, 2016).

Uma estratégia para reduzir a atividade das MMPs é por meio da inibição farmacológica. Neste sentido, a doxiciclina (DOX) é um antibiótico da classe das tetraciclina e um potente inibidor das metaloproteinases (DE SOUZA; SCHULZ; DA SILVA-SANTOS, 2015), sendo o único inibidor de MMPs aprovado para uso clínico pela *Food and Drug Administration* (FDA) (CABRAL-PACHECO et al., 2020; REMPE; HARTZ; BAUER, 2016). Estudos demonstram que a doxiciclina exerce seu efeito de inibição das MMPs por meio do efeito quelante dos íons Zn^{2+} e Ca^{2+} , que são essenciais para a atividade enzimática e também por regulação negativa da transcrição das MMPs (NUKARINEN et al., 2015; SAUER; PUTENSEN; BODE, 2022). Além disso, a doxiciclina possui efeitos imunomoduladores que podem levar a inibição da secreção de mediadores inflamatórios, como quimiocinas, citocinas, prostaglandina E2 e óxido nítrico, por meio da inibição de diversas vias inflamatórias, como NF- κ B e MAPKs, a jusante dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (SAUER; PUTENSEN; BODE, 2022).

Diversos estudos mostram que parte dos pacientes com sepse desenvolvem danos cognitivos agudos e em longo prazo (BARICHELLO et al., 2019; CALSAVARA et al., 2018a; SEKINO; SELIM; SHEHADAH, 2022; WANG et al., 2021a). O prejuízo cognitivo é três vezes mais prevalente em pacientes que sobreviveram a sepse (LI; JI; YANG, 2022), entretanto, ainda não são totalmente compreendidos quais são os mecanismos que levam ao prejuízo cognitivo das pessoas que sobrevivem a sepse e, até o momento, não há tratamento ou medicamento específico direcionado para reduzir os danos

cognitivos associados à sepse (EVANS et al., 2021; NWAFOR et al., 2019; SEKINO; SELIM; SHEHADAH, 2022). Sendo assim, este projeto mostra-se relevante devido ao fato da doxiciclina, além da sua função antimicrobiana, ser um potente inibidor de MMPs, o que pode representar uma abordagem terapêutica interessante pela possibilidade de proteger a integridade da BHE, exercendo um papel adicional na neuro proteção e desempenho cognitivo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sepse

2.1.1 Definição e epidemiologia

Segundo o Terceiro Consenso Internacional para Sepse e Choque Séptico (Sepse-3), a sepse é definida como uma disfunção orgânica provocada por uma desregulação da resposta imune do hospedeiro durante a infecção (SINGER et al., 2016). A disfunção orgânica pode ser determinada pelo escore de avaliação de falência dos órgãos por meio do *Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment (SOFA)*. Assim, o SOFA é um score de pontuação utilizado para definir a extensão e a velocidade da disfunção orgânica relacionada à sepse. O score SOFA ≥ 2 representa risco geral de mortalidade de aproximadamente 10% em uma população hospitalar com suspeita de infecção (Figura 1) (SINGER et al., 2016).

Figura 1 – Escore SOFA

Sistema	Pontuação				
	0	1	2	3	4
Respiração					
PaO ₂ /FIO ₂ , mm Hg (kPa)	≥ 400 (53,3)	<400 (53,3)	<300 (40)	<200 (26,7) com suporte respiratório	<100 (13,3) com suporte respiratório
Coagulação					
Plaquetas, $\times 10^3 /\mu\text{L}$	≥ 150	<150	<100	<50	<20
Fígado					
Bilirrubina, mg/dL ($\mu\text{mol/L}$)	<1,2 (20)	1,2–1,9 (20–32)	2,0–5,9 (101)	(33–6,0–11,9 (204)	(102–>12,0 (204)
Cardiovascular					
	PAM ≥ 70 mm Hg	PAM <70 mm Hg	Dopamina ou dobutamina (qualquer dose) ^b	<5 Dopamina ou epinefrina $\leq 0,1$ ou norepinefrina $\leq 0,1$ ^b	5,1–15 Dopamina >15 ou epinefrina >0,1 ou norepinefrina >0,1
Sistema nervoso central					
Pontuação da Escala de Coma de Glasgow c	15	13–14	10–12	6–9	<6
Renal					

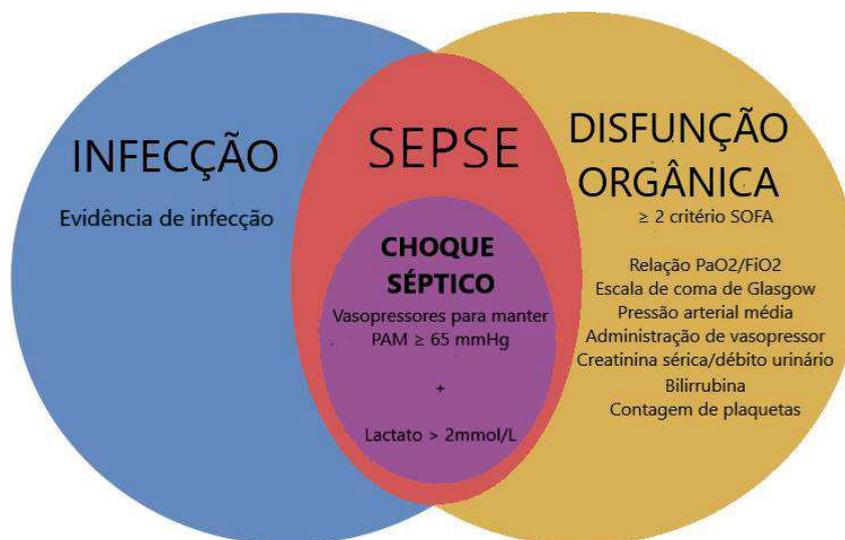
Creatinina, mg/dL (μmol/L)	<1,2 (110)	1,2–1,9 (110– 170)	2,0–3,4 (171– 299)	3,5–4,9 (300–440)	>5,0 (440)
Débito urinário, mL/d				<500	<200

FIO₂: fração inspirada de oxigênio; PAM: pressão arterial média; PaO₂: pressão parcial de oxigênio.

Fonte: Adaptado de (SINGER et al., 2016)

A sepse com anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas é definida como choque séptico, sendo essa condição associada a uma maior mortalidade quando comparada à sepse isoladamente. Clinicamente, esses indivíduos preenchem os critérios para sepse e, apesar da ressuscitação volêmica adequada, requerem vasopressores para manter uma pressão arterial média (PAM) ≥ 65 mmHg e lactato > 2 mmol/L (> 18 mg/dL). De acordo com as estimativas do escore SOFA, os pacientes que preenchem os critérios para choque séptico têm uma mortalidade maior do que aqueles que apresentam sepse isoladamente ($\geq 40\%$ versus $\geq 10\%$) (SANZ CODINA; ZEITLINGER, 2022; SINGER et al., 2016) (Figura 2).

Figura 2 – Definição de Sepse



Fonte: Adaptado de (SANZ CODINA; ZEITLINGER, 2022)

Fatores externos como virulência do patógeno, fonte de infecção, ponto temporal do diagnóstico, idade e comorbidades tornam a apresentação clínica

da sepse heterogênea, já que a resposta do hospedeiro induzida pela sepse depende desses fatores. Devido a essa heterogeneidade, sintomas inespecíficos, como aumento da frequência cardíaca e respiratória, febre e sintomas neurológicos são relatados. Esses sintomas geralmente são comuns aos pacientes e por causa da inespecificidade o diagnóstico precoce da sepse é dificultado. Outro fator que pode afetar a apresentação clínica da sepse é a disfunção orgânica, onde órgãos como coração, pulmão e o SNC podem ser prejudicados pela sepse (GAO; HERNANDES, 2021).

A sepse é considerada uma ameaça à saúde global pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e afeta milhões de pessoas todos os anos (REINHART et al., 2017). Segundo estudo realizado por Rudd et al. (2020) estima-se que em 2017 houve 48,9 milhões de casos de sepse registrados no mundo. Além disso, foi relatado 11 milhões de mortes relacionadas à sepse, o que representa 19,7% de todas as mortes mundiais. No Brasil, de acordo com o estudo SPREAD que foi realizado em 2014, o país possui uma taxa de letalidade de 55,7% que é considerada uma das maiores taxas por sepse no mundo. Estima-se que houve mais de 200.000 óbitos em pacientes adultos tratados em UTI por ano no Brasil. Nesse estudo projetou-se uma taxa de incidência de 290 por 100.000 habitantes de casos adultos de sepse tratada em UTI por ano, gerando cerca de 420.000 casos anualmente, onde 230.000 morrem no hospital (MACHADO et al., 2017). O manejo do paciente com sepse também gera custos elevados para os pacientes e hospitais. Segundo estudo recente realizado por Van Den Berg et al. (2022), os custos hospitalares totais médios por paciente com sepse variou entre € 1.101 e € 91.951. No Brasil, o custo médio total de paciente é de aproximadamente US\$ 9.632 e o custo médio diário de UTI por paciente é de US\$ 934 (SOGAYAR et al., 2008; INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE SEPSE, 2015).

Além do alto índice de mortalidade, a sepse pode causar sequelas físicas, psicológicas e cognitivas de longo prazo em pessoas que conseguem sobreviver, gerando perda da qualidade de vida e aumento de custos para os indivíduos, hospitais e governo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Um estudo de coorte prospectivo que estudou se um caso de sepse grave aumentava as chances de piora cognitiva e incapacidade funcional subsequente entre os indivíduos que sobrevivem à sepse, observou um

aumento da prevalência de comprometimento cognitivo moderado/grave de 10,6% entre os pacientes que sobreviveram à sepse grave. Foi observado também um aumento nas taxas de novas limitações funcionais após a sepse. Além disso, foi relatado que a diminuição na função cognitiva e física persistiram por até 8 anos de acompanhamento (IWASHYNA et al., 2010).

Em uma revisão sistemática realizada por Calsavara et al. (2018b), dos artigos analisados no estudo, eles observaram que o comprometimento cognitivo estava presente em 12,5 a 21% dos indivíduos que sobreviveram a sepse. Além disso, foi observado pelos autores que a sepse pode favorecer a piora do desempenho cognitivo a curto, médio e longo prazo.

2.1.2 Modelos de sepse em roedores

Para entender melhor a fisiopatologia e identificação de novos tratamentos para sepse foram desenvolvidos diversos modelos animais de sepse, como infusão bacteriana, pasta fecal, administração de endotoxinas, ligadura e punção cecal (CLP) e peritonite por *stent* de cólon ascendente. Sendo que o procedimento de ligadura e punção cecal e administração de toxinas exógenas, como o lipopolissacarídeo (LPS), são os mais utilizados (SAVI et al., 2021).

O método CLP vem sendo considerado o procedimento padrão ouro para o estudo da sepse, já que quando comparado com outros modelos ele é o que melhor reproduz o curso e a natureza da sepse humana. Além disso, por ser um procedimento simples, de origem polimicrobiana com foco infeccioso localizado e que os produtos bacterianos que são liberados na periferia levam à septicemia, esse modelo cumpre grande parte dos parâmetros fundamentais de um bom modelo de sepse (DEJAGER et al., 2011; GONG; WEN, 2019). Por meio da combinação de uma infecção polimicrobiana (causada pelo vazamento da microbiota peritoneal para o peritônio), dano tecidual (devido à laparotomia) e necrose (devido à ligadura do ceco), esse método consegue reproduzir vários fatores da sepse humana tais como, aumento das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (DEJAGER et al., 2011; SJAASTAD et al., 2020), alteração nas respostas hemodinâmicas, bioquímicas e imunes, como trombocitopenia (fenótipo pró-trombótico e pró-coagulante concomitante), leucopenia,

hipotensão, além de marcadores de disfunção orgânica (ASSINGER et al., 2019).

Fatores como idade, sexo e controle adequado da tensão da ligadura são fundamentais para a reprodutibilidade do experimento. Além disso, no modelo CLP a gravidade da sepse pode ser ajustada pela alteração de alguns fatores, como a extensão de ceco ligado, quantidade de material cecal extruído, número e tamanho da perfuração, hora do dia em que método é realizado e experiência e habilidade do cirurgião (SJAASTAD et al., 2020).

O modelo CLP também pode ser usado para investigar o comprometimento cognitivo decorrente da sepse, já que a sepse induzida por esse método pode acometer o cérebro e induzir a ativação microglial e inflamação cerebral. Vários estudos mostram que o modelo CLP conseguiu provocar comprometimento comportamental de longo e curto prazo, interferindo na atividade locomotora e memória não aversiva e aversiva (SAVI et al., 2021).

2.1.3 Fisiopatologia da sepse

Após a falha do hospedeiro em conter uma infecção em apenas uma região, o hospedeiro é exposto a componentes microbianos, microrganismos e produtos relacionados a tecidos danificados (DELANO; WARD, 2016). Essa exposição inicia uma resposta inflamatória sistêmica por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos derivados de microrganismos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos endógenos (DAMPs) (ZHANG; NING, 2021).

Os PRRs podem se localizar na membrana celular ou no espaço intracelular de células imunes e fagocitárias e em vários tipos de tecidos somáticos (DELANO; WARD, 2016). Existem diversos tipos de PRRs, sendo que os principais e mais investigados são receptores Toll-like (TLRs), domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos e família de genes contendo repetição rica em leucina (NLRs), receptores de gene induzível por ácido retinóico (RIG)-I (RLRs), receptores de lectina de tipo C (CLRs) e moléculas de detecção de DNA (PAN et al., 2022). Quando os PRRs reconhecem os PAMPs e DAMPs diversas vias de sinalização intracelular podem ser ativadas. Após ativação, a I κ B quinase (IKK) também é ativada e em seguida ubiquitinada e degradada. Consequentemente, as sequências de localização nuclear do fator

de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) são expostas, o que leva a liberação do dímero NF- κ B, que se transloca para o núcleo. No núcleo, ele ativa seu promotor e é capaz de induzir a expressão de vários genes de ativação precoce, como citocinas associadas à inflamação (TNF, IL-1, IL-12, IL-18 e IFNs) (HOTCHKISS et al., 2016; LI; JI; YANG, 2022; ZHANG; NING, 2021). As citocinas liberadas pela translocação do NF- κ B podem começar outra cascata com outras citocinas e quimiocinas inflamatórias que incluem IL-6, IL-8, IFN γ , ligante 2 de quimiocina CC (CCL2), CCL3 e ligante 10 de quimiocina CXC (CXCL10), além da polarização e supressão de componentes da imunidade adaptativa (HOTCHKISS et al., 2016). As citocinas inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-18 também podem ser geradas a partir dos inflamassomas, que são oligômeros multiproteicos citosólicos (VAN DER POLL; SHANKAR-HARI; WIERSINGA, 2021).

A resposta pró-inflamatória também pode levar a ativação do complemento, ativação do sistema de coagulação e do endotélio vascular, liberando alarminas e DAMPS, intensificando ainda mais a resposta pró-inflamatória, contribuindo para a lesão tecidual. Sendo assim, a resposta inflamatória é capaz de proporcionar mudanças na circulação sistêmica que pode levar a produção de óxido nítrico (NO), vasodilatação e hipotensão. Além disso, pode afetar a microcirculação levando a ativação da cascata da coagulação, onde a liberação de fatores pró-coagulantes é aumentada e os níveis de fatores anticoagulantes são diminuídos. Portanto, essas alterações podem favorecer a apoptose e a hipóxia (DANIELSKI et al., 2018).

Durante a sepse também ocorre uma fase de resposta anti-inflamatória. Essa fase está relacionada com o aumento da predisposição a infecções secundárias em pacientes com sepse e reativação viral. Os principais mecanismos que contribuem para a imunossupressão envolvem o prejuízo da função das células imunes, como apoptose de células T, B e células dendríticas, expansão de células T reguladoras e células supressoras derivadas de mielóides, exaustão de células T, e diminuição da expressão do isotipo DR do antígeno leucocitário humano (HLA-DR) por células apresentadoras de antígeno, além da diminuição na capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias. Essa falha em produzir citocinas pode ser regulada por mecanismos epigenéticos, liberação de citocinas anti-inflamatórias e

reguladores negativos da sinalização de TLR (VAN DER POLL et al., 2017; VAN DER POLL; SHANKAR-HARI; WIERSINGA, 2021).

Em estudos anteriores, acreditava-se que a mortalidade que ocorria nos primeiros dias da sepse era devido à resposta inflamatória e as mortes que ocorriam semanas depois era consequência da resposta anti-inflamatória compensatória através de imunossupressão e falência de órgãos. Entretanto, novos estudos mostraram que as respostas inflamatórias e anti-inflamatórias acontecem concomitantemente e isso pode favorecer a lesão de órgãos, contribuindo para complicações infecciosas que podem levar a morte do paciente com sepse (DELANO; WARD, 2016; VAN DER POLL; SHANKAR-HARI; WIERSINGA, 2021).

2.2 Fisiopatologia da sepse no cérebro

A sepse causa disfunção em vários órgãos, sendo um dos primeiros o cérebro. A disfunção no cérebro pode se apresentar como uma encefalopatia associada à sepse (EAS), que pode ser caracterizada como uma disfunção da cognição relacionada à sepse, mas sem infecção no SNC, ou lesão cerebral estrutural, após a exclusão de causas metabólicas (CALSAVARA et al., 2018b). Em cerca de 50% dos pacientes que apresentam sepse na admissão na unidade de terapia intensiva (UTI) é observado o desenvolvimento de *delirium* e coma (MANABE; HENEKA, 2022). No estágio de longo prazo a característica mais relevante da disfunção cerebral induzida pela sepse é o comprometimento cognitivo. Não existem evidências de que haja infecção direta do SNC, mas sim que diversos fatores liberados durante a sepse podem provocar a disfunção cerebral (PAN et al., 2022).

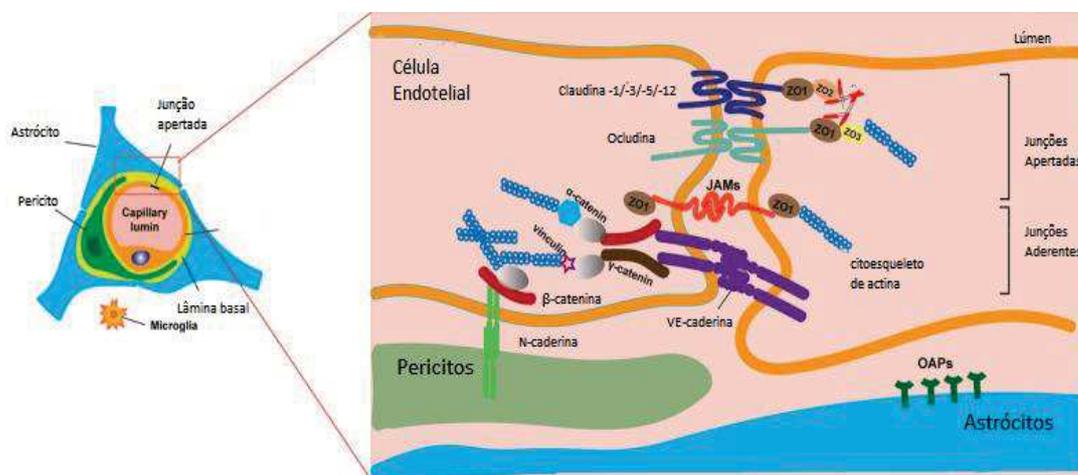
Disfunção da BHE, neuroinflamação, estresse oxidativo e processos metabólicos são mecanismos que estão relacionados com a fisiopatologia da sepse no cérebro. Esses mecanismos podem atuar de forma individual ou combinada e podem prejudicar a neurotransmissão, a circulação nos vasos sanguíneos e as vias de sinalização fundamentais do SNC (GU; MEI; ZHAO, 2021).

2.2.1 Disfunção da BHE

A BHE é uma barreira dinâmica que separa de maneira seletiva o interstício cerebral do conteúdo dos vasos sanguíneos (SEKINO; SELIM; SHEHADAH, 2022). Através da restrição de movimentos iônicos e fluidos entre o sangue e o cérebro, a barreira é essencial para manter a homeostase, microambiente cerebral, além de fornecer nutrientes essenciais ao cérebro e mediar o efluxo de diversos produtos residuais. Além disso, por dificultar a passagem de leucócitos da periferia para o SNC ela exerce um papel fundamental na imunidade cerebral (GAO; HERNANDES, 2021)

A BHE é um membro da unidade neurovascular (NVU), que é composta por neurônios, interneurônios, microglia, pés terminais de astrócitos, oligodendrócitos, pericitos, lâmina basal, células endoteliais, matriz extracelular e componentes circulantes do sangue (BARICHELLO et al., 2021). Entre as células endoteliais estão as junções apertadas e as junções aderentes, que são importantes estruturas que conseguem limitar a difusão de moléculas por meio das células endoteliais (BARICHELLO et al., 2021). As junções apertadas são compostas pelas proteínas claudina-1, claudina-3, claudina-5 e claudina-12, ocludina e as proteínas guanilato quinases associadas à membrana ZO1, ZO2 e ZO3. E as junções aderentes, são compostas por molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM1), caderinas e as moléculas de adesão juncional (JAMs) JAMA, JAMB e JAMC (SWEENEY; SAGARE; ZLOKOVIC, 2018) (Figura 3).

Figura 3 – Estrutura da BHE



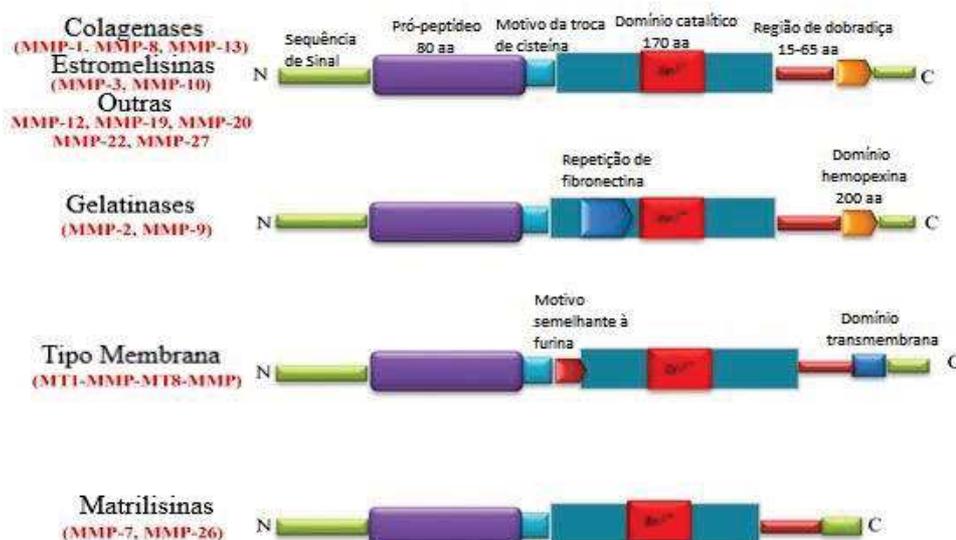
Fonte: Adaptado de (KADRY; NOORANI; CUCULLO, 2020)

Diversos estudos mostram que durante a sepse há um aumento da permeabilidade da BHE. E esse aumento na permeabilidade da BHE pode contribuir para o comprometimento cognitivo, já que o SNC fica susceptível a fatores neurotóxicos, tais como leucócitos circulantes, mediadores inflamatórios, radicais livres, plasma e proteínas intravasculares. Edema cerebral e diminuição da perfusão microvascular podem ser consequências da disfunção da BHE, que podem levar ao aumento da perda neuronal (GAO; HERNANDES, 2021). Os mecanismos de como isso ocorre ainda não estão totalmente esclarecidos, entretanto, sabe-se que a ruptura das proteínas da junção apertada, o aumento na ativação de MMP-2 e MMP-9 e o aumento do fator de necrose tumoral (TNF) são possíveis mecanismos envolvidos no aumento da permeabilidade da BHE (SEKINO; SELIM; SHEHADAH, 2022).

2.2.1.1 Metaloproteínas de matriz

As MMPs são uma família de endopeptidases multidomínio zinco-dependentes que pertencem à superfamília das metzincina-proteases. De acordo com a similaridade de sequência linear, especificidade do substrato e organização do domínio elas são divididas em subgrupos (DE ALMEIDA et al., 2022). Assim, podem ser classificadas em gelatinases, colagenases, matrilisinas, estromelisinases, MMPs do tipo membrana e outras MMPs (REN; CHEN; KHALIL, 2017) (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura das MMPs



Fonte: Adaptado de (OLEJARZ; ŁACHETA; KUBIAK-TOMASZEWSKA, 2020)

As MMPs participam de processos fisiológicos normais, como morfogênese tecidual, migração celular e angiogênese. Mas quando ativadas de forma exacerbada podem estar envolvidas em processos fisiopatológicos, como cicatrização de feridas, inflamação e câncer. Elas são produzidas e em seguida secretadas no espaço extracelular na forma de zimogênio (pró-forma inativa e latente) e são ativadas pela proteólise do pró-domínio N-terminal (REMPE; HARTZ; BAUER, 2016).

Em condições fisiológicas grande parte das MMPs é ativada por outras MMPs ou proteases no espaço extracelular, entretanto, determinadas MMPs são ativadas no meio intracelular pela enzima furina ou por outros mecanismos, como a fosforilação. Já em condições patológicas, EROs, citocinas e outros fatores, como óxido nítrico, hipóxia e pH podem levar a ativação das MMPs (REMPE; HARTZ; BAUER, 2016).

Em relação à regulação da transcrição das MMPs, mais estudos devem ser realizados para aperfeiçoar sua compreensão. O que foi estudado até o momento é de que a regulação transcricional das MMPs tende a estar relacionada à infiltração de células imunes, aumento da inflamação e tumorigênese (DE ALMEIDA et al., 2022). Um exemplo é a MMP-9 em que o TNF e a interleucina-17 podem estimular a sua transcrição. Eles fazem isso por meio da proteína ativadora dos fatores de transcrição-1 (AP-1) e do NF- κ B (REMPE; HARTZ; BAUER, 2016).

Durante a sepse as MMPs podem estar envolvidas no aumento da permeabilidade da BHE por meio da clivagem das proteínas de junção apertada, que são essenciais para manter a integridade da barreira. Estudos revelaram que a MMP-2 e MMP-9 são eficazes em clivar essas proteínas (DE ALMEIDA et al., 2022). Além disso, as MMPs também podem ser responsáveis pela ativação de vias neuro inflamatórias, por meio da ativação de enzimas, como receptores de superfície celular, citocinas, fatores de coagulação e moléculas de adesão célula-célula. As MMPs também podem facilitar a neurotoxicidade mediada por neuro inflamação, pela liberação de moléculas de morte, como o ligante Fas, afetando os níveis de glicina e GABA. (REMPE; HARTZ; BAUER, 2016).

2.2.2 Neuroinflamação

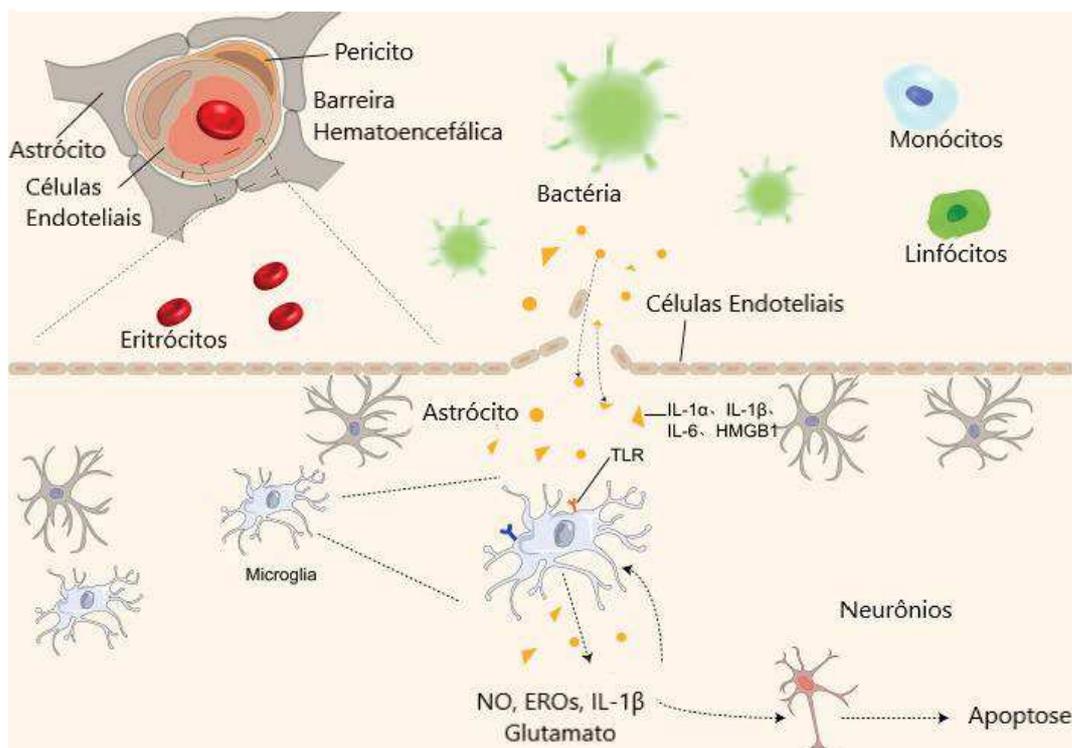
Durante a fase aguda da sepse os PRRs reconhecem os PAMPs e DAMPs, o que resulta na ativação de diversas vias de sinalização celular responsáveis pela “tempestade” de citocinas inflamatórias (PAN et al., 2022). As citocinas pró-inflamatórias podem entrar no cérebro por diferentes mecanismos (proteínas transportadoras de soluto, difusão transcelular, transcitose adsorptiva, transcitose mediada por receptor) e ativar células microglicais (NWAFOR et al., 2019; SEKINO; SELIM; SHEHADAH, 2022). Quando ativadas elas podem liberar óxido nítrico (NO), glutamato e nitrogênio, e isso pode levar a cada vez mais danos estruturais e inflamação das membranas celulares. Além disso, a interação de NO e radicais livres pode aumentar a produção de peroxinitrito (ONOO^-) cerebral, acometendo mais uma vez as células gliais, a BHE e os neurônios, induzindo disfunção cerebral. Interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, proteína box-1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1) e o TNF são as principais citocinas que afetam o cérebro durante a sepse (YAN et al., 2022) (Figura 5). Após a entrada no cérebro, as citocinas também podem se ligar a receptores como o IL-1 tipo I (IL-1R1) que ativam células gliais, as quais levam a indução de genes que codificam ciclooxigenase 2 (COX2) em células endoteliais. A COX 2 pode sintetizar prostaglandina E2 (PGE2) e ativar o receptor de prostaglandina E2 na micróglia, levando a formação de mediadores pró-inflamatórios, como a IL-1 β , IL-6, TNF e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). IL-1 β e IL-18 também podem ser produzidas no tecido cerebral via ativação do inflamassoma do domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos, repetição rica em leucina e proteína 3 contendo domínio de pirina (NLRP3) na micróglia (MANABE; HENEKA, 2022).

Sendo assim, com a ativação das células gliais, a NVU é prejudicada e pode ocorrer uma desregulação do acoplamento neurovascular com consequente morte de neurônios, ativação da micróglia, gliose, transmigração celular e dano à BHE. Esses fatores podem levar ao vazamento vascular, ao aumento do transporte transcelular e diminuição das junções apertadas (REIS; CASTRO-FARIA-NETO, 2022).

Outra condição em que a neuroinflamação pode levar ao dano cerebral é por meio da desregulação da função endotelial. Por meio da ativação da endotelina-1 e do NO, o endotélio pode ser ativado, induzindo a resposta inflamatória celular e levando à oclusão do fluxo sanguíneo, produção de

EROs, liberação de citocinas e das MMPs 2 e 9, sendo que esses fatores podem afetar a integridade da BHE. Apesar de vários estudos, ainda não está elucidado se o dano à BHE é consequência ou causa da neuroinflamação (REIS; CASTRO-FARIA-NETO, 2022).

Figura 5 – Possíveis mecanismos relacionados à neuroinflamação



Fonte: Adaptado de (YAN et al., 2022)

2.2.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo se caracteriza pelo desequilíbrio entre a formação de substâncias oxidantes e a capacidade do sistema de defesa antioxidante em remover essas substâncias (MANTZARLIS; TSOLAKI; ZAKYNTHINOS, 2017). Ele pode ser responsável por modificações de diversas biomoléculas e isso pode afetar a função celular e, em certas condições, levar a morte celular (REIS; CASTRO-FARIA-NETO, 2022).

Durante a sepse, as células microgliais do parênquima cerebral podem ser ativadas, além de ocorrer um aumento de macrófagos perivasculares na vasculatura cerebral (GU; MEI; ZHAO, 2021). Essas células podem liberar espécies reativas de nitrogênio (ERNs), NO, ONOO⁻ e EROs, como o ânion

superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), singleto oxigênio ($1O_2\bullet$) e radical hidroxila (OH), como produtos antimicrobianos. A liberação de EROs e ERNs pode causar danos às células endoteliais vasculares diretamente ou por meio da ativação do NF- κ B, o que leva ao aumento de TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8 e produção de IL-17 e IL-18 (BARICHELLO et al., 2021).

O estresse oxidativo também pode prejudicar a função mitocondrial, que é uma consequência comum da sepse e que também está relacionada com o dano cognitivo após a sepse. Os complexos I e IV da cadeia transportadora de elétrons (CTE) podem ser inibidos por EROs e ERNs. Quando inibidos, o consumo de oxigênio é diminuído e isso gera acúmulo de O_2^- , levando ao escape dessa espécie junto com outras espécies reativas por meio da CTE. As proteínas de desacoplamento podem ser ativadas pelas espécies que escaparam da CTE, levando a permeabilidade aumentada de prótons (H^+) da membrana mitocondrial interna para a matriz mitocondrial e isso pode levar a interrupção da produção de trifosfato de adenosina (ATP). O escape contínuo de prótons pode provocar hipóxia citopática (mitocôndrias são incapazes de usar oxigênio), dano ao DNA de fita simples em nível genômico e aumento da permeabilidade do retículo endoplasmático e da membrana mitocondrial. A hipóxia citopática decorrente da disfunção mitocondrial está relacionada com a falência de múltiplos órgãos e pode levar a piores prognósticos na sepse. (MANTZARLIS; TSOLAKI; ZAKYNTHINOS, 2017; NWAFOR et al., 2019).

O cérebro possui defesas antioxidantes, como as enzimas glutathione peroxidase (GPx) (catalisa a conversão de H_2O_2 em água), superóxido dismutase (SOD) (converte O_2^- em oxigênio e H_2O_2), e catalase (catalisa a conversão de H_2O_2 em água e oxigênio). Entretanto, dados da literatura mostram que quando comparado com outros órgãos, o cérebro possui menores níveis de defesa antioxidante e por isso é mais suscetível ao dano oxidativo (MANTZARLIS; TSOLAKI; ZAKYNTHINOS, 2017; REIS; CASTRO-FARIANETO, 2022). Alguns estudos mostram que a peroxidação lipídica é distribuída de forma ampla e consistente nas estruturas do córtex cerebral, cerebelo e hipocampo, já a oxidação de proteínas está restrita ao hipocampo 6 horas após a indução da sepse pelo método CLP. Além disso, também foi relatado um desequilíbrio das enzimas antioxidantes SOD e catalase, sendo observado um aumento de SOD nas primeiras 6 horas após a sepse (NWAFOR et al., 2019).

Em resumo, na sepse há um aumento na formação de EROs e ERNs por causa da ativação da resposta imune sistêmica. O aumento dessas espécies pode favorecer a peroxidação lipídica no parênquima e vasculatura cerebral. Além disso, pode ocorrer um ataque contínuo de células imunes da periferia, gerando um ciclo vicioso de formação de espécies reativas entre a periferia e o cérebro. O sistema antioxidante não consegue compensar a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e isso pode resultar em aumento da permeabilidade da BHE, neuroinflamação e isquemia. O desequilíbrio no metabolismo oxidativo pode permanecer durante todo o percurso clínico da sepse e há indícios que também persiste após a recuperação, sendo um mecanismo provável para o comprometimento cognitivo de longo prazo após a sepse (NWAFOR et al., 2019).

2.3 Alterações cognitivas na sepse e BDNF

O cérebro é um dos primeiros órgãos afetados durante a sepse e várias regiões podem ser comprometidas. Uma das principais estruturas afetadas é o hipocampo, que é responsável pela memória e aprendizagem. Pacientes que sobrevivem a sepse podem apresentar atrofia do hipocampo, que está associado com a disfunção de neurônios e a plasticidade sináptica (CUI et al., 2021).

O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) é um membro da família das neurotrofinas e a diminuição dos seus níveis está relacionada com defeitos neurogênicos. Sua distribuição se dá por todo o cérebro, mas possui níveis elevados de expressão no hipocampo (LI et al., 2021). O BDNF possui mecanismos que influenciam na memória e cognição, como o controle de interações sinápticas de curta e longa duração, neuroproteção e regulação da neurogênese, gliogênese e sinaptogênese (KOWIAŃSKI et al., 2018). Ele é sintetizado nos neurônios em uma isoforma precursora (próBDNF). Essa isoforma pode ser clivada intracelularmente pela furina e extracelularmente pelas MMPs 2 e 9 e pela plasmina, dando origem ao BDNF maduro (mBDNF). As duas formas conseguem exercer sua ação fisiológica quando presentes no espaço extracelular (BAZZARI; BAZZARI, 2022; KOWIAŃSKI et al., 2018). Entretanto, o próBDNF e o mBDNF possuem ações fisiológicas opostas. O próBDNF, quando liberado se liga e ativa a sortilina e ao receptor da

neurotrofina p75 (p75 NTR), iniciando cascatas de sinalização que podem culminar em efeitos que promovem a morte celular e atenuam a transmissão sináptica. Já o mBDNF quando liberado se liga no receptor da tropomiosina quinase B (TrkB) e possui efeitos como crescimento e atividade sináptica e aumento da sobrevivência neuronal (BAZZARI; BAZZARI, 2022; KOWIAŃSKI et al., 2018).

Estudos mostram que o BDNF pode estar reduzido durante a sepse e a regulação negativa da sinalização de BDNF por meio de TrkB pode induzir o comprometimento da memória (QIU et al., 2020), sendo então outro possível mecanismo relacionado ao dano cognitivo observado em pacientes que sobrevivem a sepse. A neuroinflamação e estresse oxidativo podem contribuir para regulação negativa do BDNF em doenças neurodegenerativas. No estudo de Qiu et al. (2016) a liberação de IL-1 β e ativação microglial induzida por anestesia e cirurgia resultou na regulação negativa de BDNF hipocampal, sendo relacionado com deficiências cognitivas dependentes do hipocampo em camundongos idosos.

Em relação ao estresse oxidativo, no estudo de Della Giustina et al. (2020) ratos Wistar submetidos a CLP apresentaram estresse oxidativo no tecido cerebral, que foi relacionado com a diminuição de BDNF e comprometimento cognitivo. A ligação do BDNF ao receptor TrkB pode levar a ativação da proteína quinase ativada por Ras/mitógeno (MAPK), levando a liberação da neurotrofina dependente da proteína de ligação do elemento de resposta ao cAMP (CREB). O CREB é um fator de transcrição que está relacionado à transcrição de genes ligados à plasticidade neuronal e remodelamento de sinapses. A ligação do CREB ao DNA pode ser afetada negativamente pelo estresse oxidativo, podendo resultar na redução da expressão de BDNF (DELLA GIUSTINA et al., 2017).

Portanto, a regulação negativa do BDNF pode afetar a memória e o aprendizado e pode estar relacionado com as alterações cognitivas observadas em pacientes que sobrevivem a sepse (QIU et al., 2020; REIS; CASTRO-FARIA-NETO, 2022). Sendo então um possível alvo de agentes terapêuticos e marcador de comprometimento cognitivo. Mecanismos como a neuroinflamação e estresse oxidativo, que ocorrem durante a patogênese da sepse, podem afetar a regulação dessa neurotrofina.

2.4 Doxiciclina

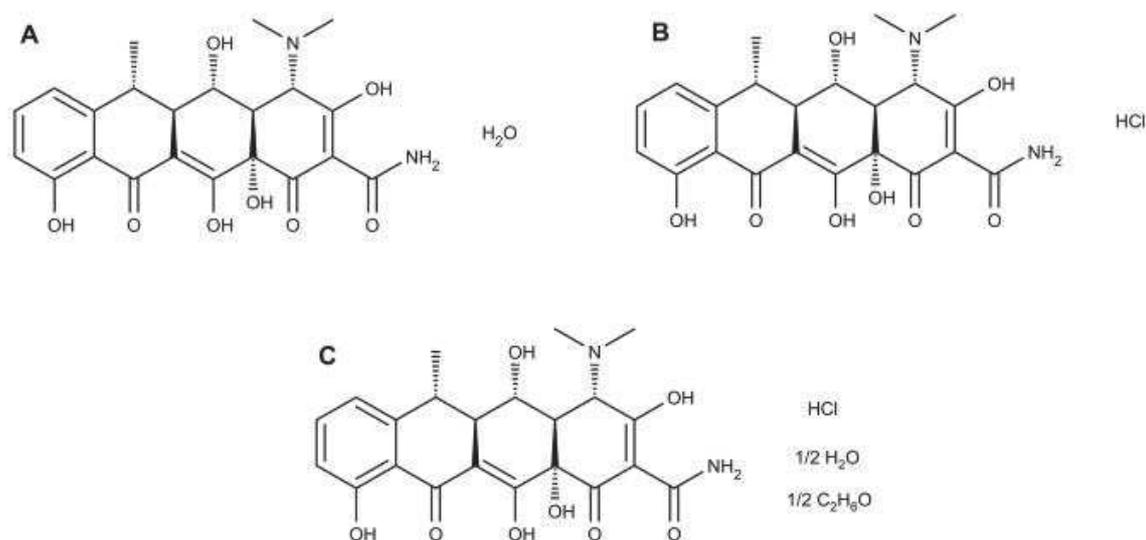
O tratamento adequado da sepse, como o controle da fonte da infecção, antibióticos, ressuscitação e cuidados de suporte é capaz de reduzir a mortalidade dessa doença, entretanto, pessoas que sobrevivem a sepse podem apresentar sequelas físicas e neurológicas, como déficits cognitivos (VAN DER POLL; SHANKAR-HARI; WIERSINGA, 2021). Ainda não há nenhum tratamento específico direcionado para as sequelas neurológicas. Assim, sabendo-se que a perda da integridade da BHE é um fator que pode levar ao prejuízo cognitivo e que um importante mecanismo que pode levar à alterações na integridade da BHE é o aumento na atividade de MMPs, alguns estudos começaram a utilizar inibidores específicos de metaloproteinases (DAL-PIZZOL et al., 2013; EVANS et al., 2021). Vários inibidores específicos de MMPs sintéticos foram desenvolvidos e testados em ensaios clínicos (BISSETT et al., 2005; BRAMHALL et al., 2002; CHU et al., 2007; PARSONS; WATSON; STEELE, 1997), entretanto, devido a efeitos colaterais musculoesqueléticos graves e a falta de eficácia comprovada, nenhum deles foi validado em estudos humanos até o momento (DE ALMEIDA et al., 2022; GRIFFIN et al., 2010a).

A doxiciclina é um antibiótico sintético de terceira geração da família das tetraciclina e possui amplo espectro (HADJIMICHAEL et al., 2022). Ela exerce seu efeito antibiótico pela inibição da síntese de proteínas bacterianas por meio da ligação reversível à unidade ribossômica 30S (MARKULIN et al., 2022). Desde 1967 ela é comercializada para uso humano e devido ao seu espectro amplo de ação, contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos, ela compõe a lista de medicamentos essenciais da OMS. No momento atual, a doxiciclina é utilizada para tratar pneumonias adquiridas na comunidade, infecções de pele e partes moles, otite média aguda, rinosinusite bacteriana aguda, periodontite, exacerbação aguda de doença pulmonar obstrutiva crônica e também para a profilaxia da malária causada por *Plasmodium falciparum* (FEITOSA et al., 2022).

A doxiciclina é composta por um núcleo de quatro anéis que estão ligados a vários grupos laterais. O grupo dimetilamino no carbono C4 é o grupo responsável pela atividade antimicrobiana. A parte inferior da molécula

funciona como um sítio para quelação de íons metálicos (GRIFFIN et al., 2010a). Dentre as tetraciclinas, a doxiciclina é a que tem maior eficácia em atravessar as membranas celulares, além de um tempo de meia-vida prolongado e menor toxicidade renal. Quando na forma de cloridrato e sais hclatos, a classificação biofarmacêutica da doxiciclina está na classe I (FEITOSA et al., 2022) (Figura 6).

Figura 6 - Estrutura molecular da doxiciclina na forma (A) monohidratado , (B) cloridrato e (C) hclato



Fonte: Adaptado de (FEITOSA et al., 2022)

Além da sua atividade antimicrobiana, a doxiciclina também é um potente inibidor de MMPs, exercendo sua inibição pela regulação negativa da transcrição de MMPs e também por inibição da atividade de protease, por meio da quelação dos íons Zn^{2+} e Ca^{2+} , que são fundamentais para a atividade das MMPs (GRIFFIN et al., 2010a; NUKARINEN et al., 2015). Em relação à regulação negativa da transcrição, como a transcrição de MMPs pode ser favorecida por citocinas como IL-1, IL-6, TNF, hipotetiza-se que as tetraciclinas podem afetar essas cascatas de sinalização, que são responsáveis pela expressão de MMPs (GRIFFIN et al., 2010b).

A doxiciclina (Periostat®) é o único inibidor de MMPs aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e seu uso é indicado na doença periodontal (CABRAL-PACHECO et al., 2020). O Periostat® é usado duas

vezes ao dia na dose de 20 mg por via oral. Nessa concentração, ele é capaz de inibir MMPs, entretanto, possui uma ação subantimicrobiana e por isso não promove efeitos colaterais da síndrome musculoesquelética e também não ocorre o desenvolvimento de resistência microbiana a antibióticos (SORSA et al., 2006).

A doxiciclina também pode ter a capacidade de reduzir a inflamação e a morte celular. Alguns mecanismos propostos para essa ação são por meio da diminuição da ativação e proliferação microglial, inibição das vias de sinalização da MAPK e NF- κ B e inibição da expressão da iNOS e da interleucina IL-1 β . Esses mecanismos são essenciais para regular a expressão de mediadores pró-inflamatórios (RAHMANI; NEGRO ÁLVAREZ; HERNÁNDEZ, 2022).

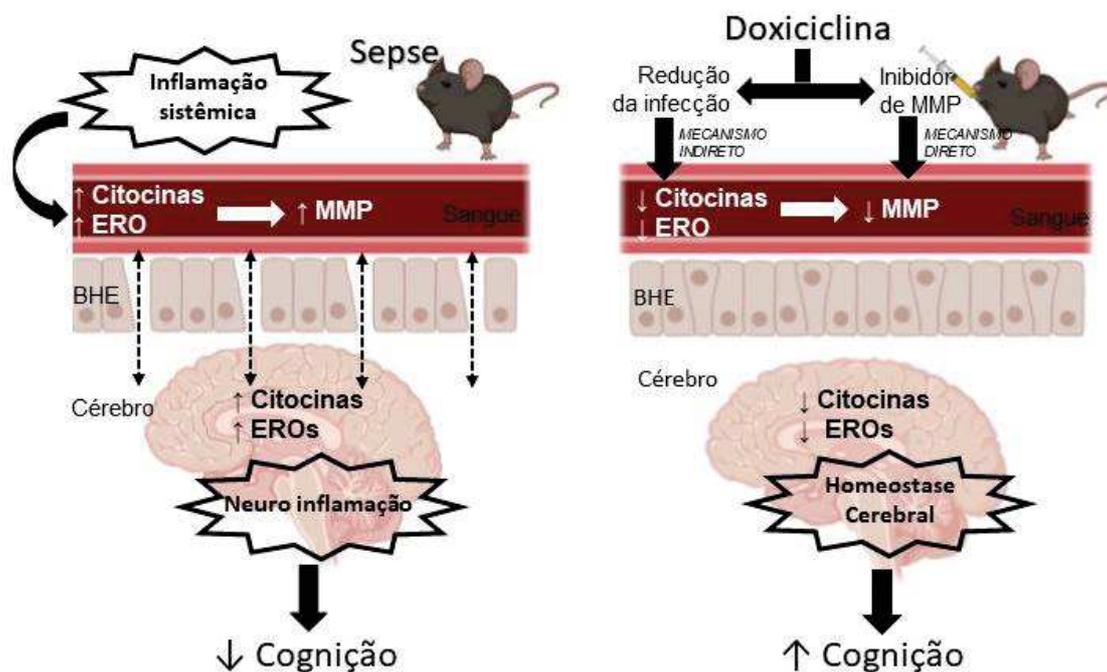
Além disso, a doxiciclina também pode ser eficaz para a eliminação de EROs pela presença do anel de fenol de substituição múltipla em sua estrutura. Quando esse anel de fenol reage com algum radical livre acarreta na formação de um radical fenólico não reativo e relativamente estável. Outro mecanismo que a doxiciclina pode afetar o estresse oxidativo é por meio da redução da expressão proteica e atividade enzimática da iNOS, que tem como consequência a diminuição dos níveis de NO, reduzindo então a sua reação com radicais de oxigênio (MARKULIN et al., 2022).

A doxiciclina, por causa de seus efeitos imunomoduladores, vem sendo estudada em diversas patologias, sendo que já foram registrados efeitos benéficos anti-inflamatórios desse antibiótico em doenças pulmonares crônicas, neurodegenerativas e distúrbios autoimunes. Além disso, é considerada tratamento padrão na periodontite, acne e rosácea (SAUER; PUTENSEN; BODE, 2022).

Sendo assim, a hipótese da pesquisa baseia-se no fato de que o tratamento com a doxiciclina, um antibiótico com capacidade de inibir metaloproteinases, poderá ser eficiente na inibição da MMP-9 cerebral, tanto de forma direta quanto indireta, melhorando a integridade da BHE e reduzindo a neuroinflamação e o dano oxidativo, o que poderá levar a uma melhora do desempenho cognitivo dos animais sépticos (Figura 7). Para respondermos à essa hipótese, os animais sépticos foram tratados com a doxiciclina, em duas doses diferentes, além de um grupo tratado com a ceftriaxona. A ceftriaxona é

um antibiótico cefalosporínico, que possui amplo espectro, entretanto, sem capacidade de inibir as MMPs (GRÉGOIRE et al., 2019; RICCI et al., 2020). Assim, iremos verificar se o efeito do tratamento com a doxiciclina está associado ao seu efeito antimicrobiano, ou à sua capacidade de inibir MMPs ou a associação de ambos os efeitos (antimicrobiano e inibidor de MMPs).

Figura 7 - Hipótese do efeito da doxiciclina na melhora cognitiva dos animais sépticos



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da doxiciclina (um inibidor de metaloproteinases) na possível melhora cognitiva de camundongos com sepse polimicrobiana e os seus mecanismos subjacentes

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Ensaio *in silico*

- Analisar as possíveis interações da doxiciclina e ceftriaxona com a MMP-9

3.2.2 Ensaio *in vivo*

Em animais sépticos, submetidos ou não ao tratamento com a doxiciclina (antibiótico inibidor de MMPs) e ceftriaxona (antibiótico sem capacidade de inibir MMPs), avaliar:

- A taxa de sobrevivência dos animais;
- O perfil inflamatório sistêmico;
- A integridade da BHE;
- O perfil inflamatório cerebral;
- O perfil redox cerebral;
- Os níveis de BDNF no hipocampo;
- O desempenho cognitivo dos animais.

4 METODOLOGIA

4.1 Docking e Dinâmica Molecular

Para analisar possíveis interações entre os ligantes doxiciclina e ceftriaxona com a MMP-9 foi utilizada a técnica de docking molecular seguida de uma dinâmica molecular. Os experimentos de modelagem molecular foram realizados em colaboração com a aluna de iniciação científica Gabrielly Guimarães Coutinho sob orientação do Prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga do DEFAR-UFOP.

4.1.1 Docking Molecular

Inicialmente foram geradas as estruturas tridimensionais dos fármacos doxiciclina e ceftriaxona. Para isso utilizou-se o módulo *cxcalc* do Marvin (CHERINKA et al., 2019) e considerou-se o pH fisiológico para definir um estado de ionização majoritário e as estruturas tiveram a energia estérica minimizada no programa Avogadro (HANWELL et al., 2012), utilizando 10000 etapas do algoritmo *steepest descent* com o campo de força MMFF94 e critério de convergência de 10^{-7} .

A estrutura tridimensional da MMP-9 foi obtida do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB, código 6ESM) (NUTI et al., 2018). Trata-se de uma estrutura complexada ao ligante BE4 no seu sítio catalítico. A estrutura da proteína foi preparada no programa GOLD (JONES et al., 1997) adicionando-se os hidrogênios e removendo-se as águas e demais moléculas, exceto pelos íons cálcio e zinco.

O docking molecular foi realizado no programa GOLD, utilizando uma área de busca de 6 Å ao redor do ligante cristalográfico BE4 e a função de pontuação ChemPLP. Foram realizadas 100 corridas independentes para cada ligante preparado, incluindo o ligante cristalográfico BE4 preparado seguindo o mesmo protocolo descrito acima para os fármacos. A busca foi realizada utilizando um algoritmo genético com os parâmetros de busca no padrão do programa, eficiência de pesquisa de 100% e 150.000 operações mínimas.

Para a validação do docking e como meio de referência de pontuação foi realizado o *redocking* com o ligante cristalográfico BE4, e a pose obtida

comparada com a conformação cristalográfica por meio da raiz quadrada do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD).

Após a obtenção dos resultados de pontuação do docking, foi realizado a normalização das pontuações obtidas, através da fórmula:

$$Score_{normalizado} = \frac{score}{N^{2/3}}$$

Onde N equivale ao número de átomo de cada molécula, excluindo-se os hidrogênios e $score$ corresponde a pontuação atribuída pelo ChemPLP para a melhor corrida de cada ligante.

4.1.2 Dinâmica molecular

A dinâmica molecular foi realizada no programa GROMACS (ABRAHAM et al., 2015) a partir da melhor pose do docking obtida para cada ligante e o mesmo arquivo PDB para a proteína. A topologia da proteína foi gerada utilizando o campo de força Amber99sb (LINDORFF-LARSEN et al., 2010) modificado para incluir parâmetros de interação com átomo de zinco (MACCHIAGODENA et al., 2019, 2020). A topologia dos ligantes foi gerada no Acpype, utilizando o campo de força GAFF (SOUSA DA SILVA; VRANKEN, 2012; WANG et al., 2004). Uma caixa dodecaédrica centrada na proteína com limites mínimos de 1,5 nm dessa foi solvatada utilizando o modelo de água TIP3P. Além disso, foram acrescentados íons Cl^- e Na^+ para neutralizar o sistema e obter uma concentração de íons de 0,15 M. O sistema foi minimizado pelo algoritmo *steepest descent* para minimizar interações desfavoráveis e, em seguida, equilibrado em condições NVT e NPT de 1 ns cada. Utilizou-se o termostato V-rescale com temperatura alvo de 310 K e o barostato Berendsen com a pressão alvo de 1 bar. As simulações de 25 ns de dinâmica molecular nos sistemas equilibrados utilizaram o integrador *leap-frog* com um intervalo de 2 fs sob condições periódicas de contorno. Interações eletrostáticas de longa distância foram tratadas utilizando o método *Particle Mesh Ewald* (PME) com um *cutoff* de 1,2 nm, enquanto interações de curtas distâncias foram tratadas pelo método de Verlet com o mesmo valor de *cutoff*. Ligações dos hidrogênios aos demais átomos foram restritas pelo algoritmo LINCS e o barostato alterado

para Parrinello-Rahman na fase de produção. As energias e coordenadas das trajetórias foram salvas a cada 10 ps para análise (LEMKUL, 2019).

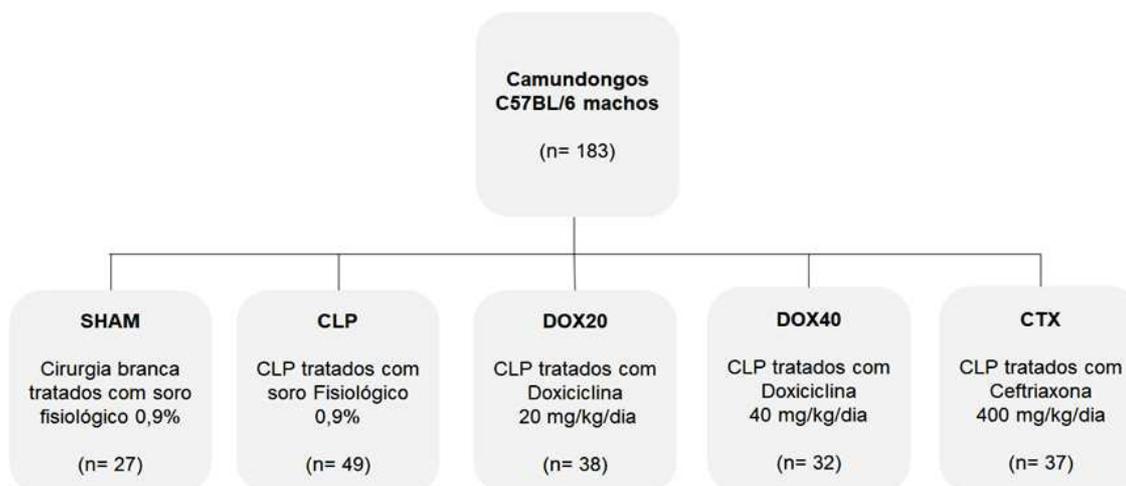
Para analisar a estabilidade do complexo foram analisadas a variação da temperatura, densidade e pressão durante a equilibração. O raio de giro e o RMSD da proteína e Flutuação Quadrática Média (RMSF) dos resíduos da proteína também foram analisados durante a dinâmica molecular para avaliar a estabilidade da proteína na simulação. O cálculo do RMSD dos ligantes a partir da pose do docking foi realizado desconsiderando os hidrogênios destes. Por fim, as trajetórias foram inspecionadas no VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) e as interações calculadas no PyContact (SCHEURER et al., 2018).

4.2 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 183 camundongos isogênicos C57BL/6 machos, com 8 a 12 semanas de idade, provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP, sob protocolo nº 1310110521.

Os animais foram distribuídos em cinco grupos: **Grupo 1:** animais submetidos à cirurgia branca e tratados com soro fisiológico 0,9 % (SHAM) (n=27); **Grupo 2:** animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e tratados com soro fisiológico 0,9 % (n=49); **Grupo 3:** animais submetidos à CLP e tratados com doxiciclina na concentração de 20 mg/kg/dia (DOX20) (n=38); **Grupo 4:** animais submetidos à CLP e tratados com doxiciclina na concentração de 40 mg/kg/dia (DOX40) (n=32); **Grupo 5:** animais submetidos à CLP e tratados com ceftriaxona na concentração de 400 mg/kg/dia (CTX) (n=37) (Figura 8).

Figura 8 - Distribuição dos grupos experimentais



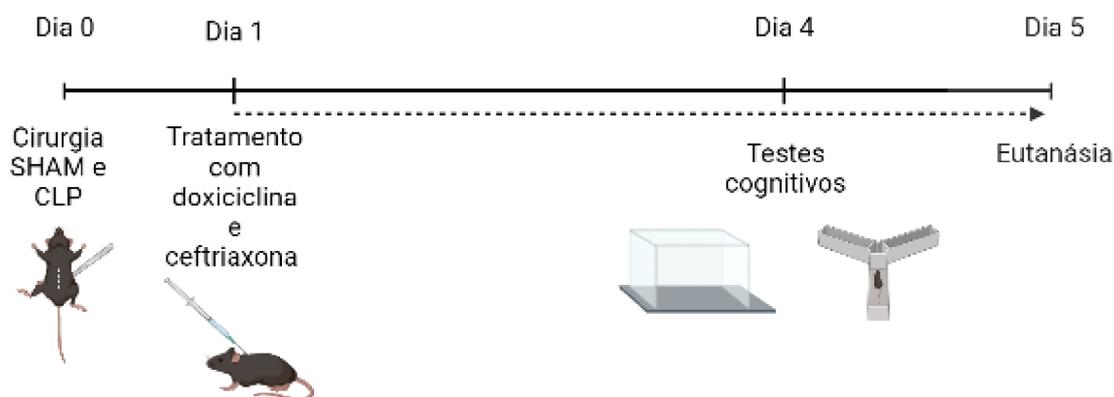
Fonte: Elaborado pela autora (2023)

A ceftriaxona foi utilizada como um controle da doxiciclina, para averiguarmos se o efeito da doxiciclina seria por meio da inibição de MMPs ou por sua ação antimicrobiana, ou ambos. A cirurgia CLP foi realizada conforme protocolo padronizado por CALSAVARA et al., (2015). Vinte e quatro horas após a indução da sepse iniciou-se os tratamentos com a doxiciclina e ceftriaxona, os quais foram realizados por meio de uma injeção subcutânea diária durante o período de 05 dias. No quarto dia de tratamento os animais foram submetidos aos testes cognitivos. No quinto dia, uma parte dos animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta de sangue, hipocampo e córtex cerebral e outra parte dos animais receberam o corante azul de Evans para a avaliação da integridade da BHE (Figura 9).

As doses de doxiciclina (UpVet, Lote: 117967/4) e ceftriaxona (Eurofarma, Lote: 739033A) utilizadas neste estudo foram baseadas em resultados disponíveis na literatura (PALDINO et al., 2020; ROBINSON et al., 2022) e levaram em consideração o cálculo para dose equivalente para uso humano (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008). Este cálculo é realizado usando a fórmula que converte a dose usada em camundongo em uma dose para seres humanos com base na área de superfície corporal (K_m), conforme apresentado na fórmula: Dose equivalente para humano (mg/kg) = dose animal (mg/kg) x (k_m animal/ k_m humano). Neste sentido, a dose de 20 mg/kg/dia se

refere a 100 mg/dia para humanos, a dose de 40 mg/kg/dia se refere a 200 mg/dia para humanos e a dose de 400 mg/kg/dia se refere a 2000 mg/dia para humanos.

Figura 9 - Delineamento Experimental



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

4.3 Procedimento cirúrgico CLP e SHAM

Para a realização da cirurgia CLP e SHAM primeiramente foram feitos os cálculos para determinação da dose de anestésico utilizada. Para isso os animais foram pesados. Feitos os cálculos, foi injetado através da via intraperitoneal 80 mg/kg de ketamina e 10 mg/kg de xilazina para sedação e anestesia dos animais. A ausência de resposta a estímulos externos foi monitorada através do pinçamento e cauda dos animais. Em seguida, foi feita a tricotomia e antissepsia com gaze embebida em álcool 70% da região abdominal dos camundongos. Após isso, uma incisão longitudinal na linha média abdominal foi realizada com uma lâmina de bisturi. O ceco foi localizado e exteriorizado com o auxílio de uma pinça anatômica. Em seguida, foi feita a ligadura do ceco com fio para sutura Nylon 4-0 abaixo da válvula ileocecal (75% do ceco ligado), com cuidado para não obstruir e comprometer o trânsito intestinal. Estando o ceco ligado, foi feita a perfuração deste utilizando uma agulha 21G entre a ligadura e a ponta distal do ceco na mesentérica-antimesentérica. Após isso, foi realizada a extrusão de uma pequena gotícula de fezes tanto dos furos mesentéricos quanto antimesentéricos e em seguida o

ceco foi realocado para o interior da cavidade abdominal. A incisão longitudinal foi fechada através de uma sutura interrompida simples por planos. Em seguida, foi realizada a ressuscitação volêmica através da administração subcutânea de solução salina pré-aquecida a 37° C na dose de 0,5mL/10g na topografia da nuca dos animais. Os animais em que foi feita a cirurgia branca foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos descritos acima, entretanto, o ceco não foi perfurado e nem ligado. Por fim, os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma manta térmica e monitorados até acordarem da anestesia. A indicação de que acordaram foi quando tiveram a capacidade de virar de forma independente em decúbito ventral após serem colocados em decúbito dorsal. Após acordarem os animais foram transferidos para caixas de polipropileno e acompanhados duas vezes ao dia para o registro da mortalidade após a cirurgia.

4.4 Dosagem de citocinas

As citocinas TNF, IL-6, IL-10 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foram quantificadas no tecido cerebral e soro dos animais por meio do ensaio imunoenzimático, ELISA quantitativo tipo sanduíche utilizando Kits da PEPROTECH®, NJ, EUA (número de catálogo 900-K54, 900-K50, 900-K53, 900-K99, respectivamente), conforme as recomendações do fabricante. As reações foram obtidas por leitura em espectrofotômetro a 405nm e correção do comprimento de onda a 630nm.

Para a quantificação de citocinas no córtex cerebral 30 mg de tecido cerebral foram homogeneizados em 200 µL de PBS. Após homogeneização a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi coletado para a dosagem.

4.5 Zimografia

A MMP-9 foi detectada usando a técnica de zimografia, conforme descrito anteriormente (ARAUJO et al., 2015; MIRANDA et al., 2018). Foram utilizados 50 mg de tecido cerebral homogeneizados em 200 µL de tampão RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1% IGEPAL, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, pH 8,0) e coquetel inibidor de protease (1:1000). Após a homogeneização foi feita a centrifugação por dez minutos, 10.000 rpm a 4°C e

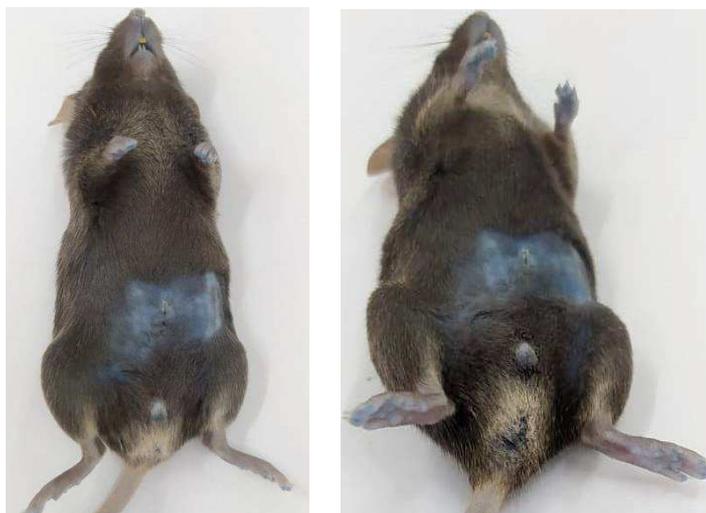
o sobrenadante foi coletado. Em seguida, foi realizada por meio do método de BCA a análise quantitativa da concentração de proteínas totais. Essa dosagem foi feita utilizando kit comercial, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Com os valores de proteínas de cada amostra, foi feito o cálculo do volume necessário para atingir 30 µg de proteínas para cada amostra. Também foi realizado o cálculo de volume necessário de tampão RIPA (sem inibidor de protease) e tampão de amostra (6X) para SDS-PAGE. A zimografia foi executada utilizando gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 8% copolimerizado com gelatina do tipo A de pele suína (2mg/mL), e gel de empilhamento a 5% (w/v). Foram utilizadas placas de 0,75mm. Foi aplicado no gel 3 µL do padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad) e 5 µL de amostra que continha 30 µg de proteínas. As amostras foram aquecidas a 37°C por dois minutos antes de serem aplicadas no gel. A corrida de eletroforese foi realizada a 100 v por 120 minutos. Após a corrida, os géis foram lavados três vezes por 20 minutos com Triton X-100 a 2,5%, com o objetivo de remover o SDS. Após a lavagem os géis foram incubados por 36 horas a 37°C com solução de incubação (50mM Tris-HCl; 0,15M de NaCl; 5mM de CaCl₂). Por fim, os géis foram corados com Coomassie Brilliant blue G-250 a 0,05% durante três horas e descorados com solução de descoloração (4% metanol, 8% ácido acético e água). Na técnica de zimografia a atividade das MMPs corresponde a bandas de atividade proteolíticas claras. A densidade óptica de cada banda foi detectada e quantificada através do software Image J (versão 8).

4.6 Azul de evans

Para avaliar a integridade da BHE foi utilizada a técnica de extravasamento do corante azul de evans (LI et al., 2021; MANAENKO et al., 2011). Essa técnica foi padronizada no Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM) com esse projeto de pesquisa. Inicialmente foi injetado 200 µL de azul de evans 2% diluído em solução salina 0,9% pela via intraperitoneal. Foram realizados testes com o tempo em que o corante circularia no camundongo (1 e 2 horas), sendo que o melhor resultado foi obtido em 2 horas. Após o tempo de circulação de 2 horas do corante, as patas e focinho dos camundongos apresentaram coloração azul, confirmando que o corante circulou pela corrente

sanguínea (Figura 10). Em seguida, os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) para a realização da perfusão cardíaca com solução salina fisiológica. Após a perfusão, o córtex cerebral foi retirado, pesado e adicionado em um tubo contendo 1,5 mL de formamida. Os tubos foram então incubados a 60 °C por 24 h. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos. 200 µL do sobrenadante foi removido e adicionado à uma placa de 96 poços. A absorbância foi detectada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 630 nm. O teor de azul de evans no tecido cerebral foi calculado através da seguinte fórmula: Teor de azul de evans no tecido cerebral (µg/g) = [teor de azul de evans na amostra a ser testada (µg/mL) * capacidade de formamida (mL)]/peso úmido do cérebro (g). O teor de azul de evans da amostra testada foi obtido de acordo com a equação de regressão da curva padrão.

Figura 10 - Camundongo após duas horas da aplicação do corante azul de evans



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

4.7 Avaliação da expressão gênica

4.7.1 Oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Para amplificar os genes CLDN1, CLDN5, OCLN, TJP1 e GAPDH os iniciadores utilizados foram desenhados a partir de sequências de mRNA disponibilizadas no banco de dados “Mouse Genome Database” e através do

programa NCBI/Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). As sequências utilizadas estão descritas na tabela abaixo:

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para a análise de RT-qPCR

GENE	PRIMER	AMPLICON
ZO-1	F' GTTGGTACGGTGCCCTGAAAGA	133
	R' GCTGACAGGTAGGACAGACGAT	
CLDN 1	F' CAACCCGAGCCTTGATGGTA	89
	R' CAGGCACCTCATGCACTTCA	
CLDN 5	F' TAAGGCACGGGTAGCACTCA	120
	R' GGCACCGTCGGATCATAGAA	
OCLN	F' CTCGGTACAGCAGCAATGGT	86
	R' GTCCGTCCTCTTGCCCTTTC	
GAPDH	F' ATGTGTCCGTCGTGGATCTG	113
	R' GTAGCCCAAGATGCCCTTCA	

ZO-1: zona ocludens 1; CLDN1: Claudina 1; CLDN5: Claudina 5; OCLN: Ocludina; GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

4.7.2 Extração do RNA

O RNA foi extraído do córtex cerebral dos camundongos utilizando o kit de extração e purificação de ácidos nucleicos por *beads* magnéticas EXTRACTA KIT - RNA de tecido (MTTD-PU16-B/W), conforme as instruções do fabricante. Brevemente, 30 mg de tecido cerebral foi adicionado em um microtubo de 1,5 mL que continha 200 µL de solução tampão para processamento das amostras e 20 µL de proteinase K e incubado por 30 minutos a 55°C. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex por 2 minutos e logo depois centrifugados por 5 minutos, 1000 rpm, 10 °C. 300 µL do sobrenadante foram transferidos para o poço correspondente da placa. A placa foi inserida no extrator automático para início da extração e após a finalização do programa, a placa foi retirada do extrator e o RNA purificado foi transferido para um novo tubo.

O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm. A pureza foi avaliada através da relação entre os

comprimentos de onda 260/280 e a contaminação por meio da relação 260/230.

4.7.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o *Kit Capacity cDNA reverse transcription*, conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, 2 µg de RNA total extraído foi utilizado e em seguida foi adicionado para cada reação 2 µL de primers randômicos (10× RT Random primer), 2 µL de RT Buffer 10×, 0,8 µL de dNTPs [25× dNTP Mix (100mM)], 1 µL de enzima transcriptase reversa (Multi Scribe® Reverse Transcriptase- 50 U/µL) e 4,2 µL de água livre de RNase. Após adição de todos os componentes da reação, os tubos foram incubados em termociclador, configurando-o da seguinte forma: 25°C por 10 minutos; 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas.

4.7.4 Reação da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Para obter um volume final de 10 µL foi adicionado em uma placa de 96 poços 1 µL de cDNA, 0,5 µL do primer forward, 0,5 µL do primer reverse, 5 µL Power de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 3 µL de água livre de DNase. Em seguida, a placa foi colocada no aparelho ABI 7300 Applied Biosystems e seguindo a programação pré-estabelecida a reação aconteceu.

Ao final da reação, obteve-se curvas de dissociação do produto confirmando a especificidade de cada um. Para a análise dos dados foi utilizado o método de quantificação relativa da expressão gênica (Cq comparativo ou ΔCq). Esse método possibilita a quantificação de diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as amostras. Para determinar a expressão dos genes alvo, foi feita a diferença de expressão do gene alvo e a expressão do gene de referência (GAPDH).

4.8 Determinação do perfil redox

A avaliação da concentração das proteínas totais foi realizada nos homogenatos de cérebro para a mensuração de SOD, catalase, TBARS e proteína carbonilada. Os valores encontrados na dosagem de proteínas foram

usados nas fórmulas para determinar a atividade das enzimas e a concentração dos biomarcadores de dano oxidativo. O ensaio para determinar a concentração de proteínas totais foi realizado através do método de Lowry et al. (1951).

4.8.1 Atividade da superóxido dismutase

Para a atividade da superóxido dismutase homogeneizou-se 50 mg de tecido cerebral em 500 μ L de tampão fosfato 0,1M pH 7,2. Em seguida a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi coletado para a dosagem. Foi pipetado na placa de 96 poços 30 μ L da amostra diluída 20 vezes, 99 μ L de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, 6 μ L de MTT e 15 μ L de pirogalol. A placa foi incubada em estufa a 37°C por 5 minutos e em seguida 150 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado em todos os poços para parar a reação. Foi realizada a leitura das absorbâncias em leitor de ELISA a 570 nm. Para o cálculo da atividade, as absorbâncias das amostras foram subtraídas pelo valor do branco e o valor encontrado foi dividido pela absorbância do padrão. Esse valor foi multiplicado pelo fator de diluição e dividido pela quantidade de proteínas totais de cada amostra.

4.8.2 Atividade da Catalase

Para a atividade da catalase 50 mg de tecido cerebral foram homogeneizados em 500 μ L de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4. Após a homogeneização foi feita a centrifugação por dez minutos, 10.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi coletado. 10 μ L da amostra foram adicionados a 990 μ L da solução de trabalho. Em seguida, durante dois minutos, a cada trinta segundos, foram determinadas as absorbâncias em um comprimento de onda de 230 nm. Como branco utilizou-se tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,0. A solução de trabalho consistia em tampão fosfato de potássio (50mM, pH 7,0) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Antes de iniciar o teste foi conferida a concentração da solução de trabalho que deveria ser de 10mM. Para o cálculo da concentração dessa solução foi utilizada a seguinte fórmula: $C = 21,81 \times \text{Absorbância} - 0,360$. O cálculo da atividade da catalase foi realizado com base na Lei de Lambert-Beer, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade Catalase (U/L)} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon \text{H}_2\text{O}_2} \times \frac{\text{VT}}{\text{VA}} \times 10^3 \times \text{Fator de diluição}$$

Sendo:

ΔAbs = Absorbância inicial – Absorbância final

Δt = 2 minutos

$\epsilon \text{H}_2\text{O}_2$ (230 nm) = 81 L.mmol⁻¹.cm⁻¹

VT = Volume total de reação

VA = Volume de amostra

10³ = Conversão de mmol para μmol (de acordo com a definição de atividade enzimática)

4.8.3 Dosagem de TBARS

Para a determinação da concentração do biomarcador de dano oxidativo TBARS foi utilizado 50 mg de tecido cerebral que foram homogeneizados em 200 μL de tampão Tris/HCl (20 mM, pH 7,4). Após homogeneização, a amostra foi centrifugada por dez minutos, 10.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi coletado. 150 μL de amostra, 75 μL de ácido tricloroacético (TCA) (10%), 75 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 37,5 μL de hidroxitolueno butilado (BHT) foram adicionados em um microtubo de 1,5 mL e incubados por 15 min, a 95 ° C. Em seguida, essa mistura foi colocada no gelo por 5 minutos. Após os 5 minutos, 200 μL da amostra foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e adicionou-se 200 μL de álcool butílico. Essa mistura foi agitada em vórtex e centrifugada por 10 min a 13.000 rpm a 4 ° C. 200 μL do sobrenadante foi retirado e colocado em placas de 96 poços. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 535 nm. O cálculo da concentração de TBARS foi realizado através da equação da reta obtida da curva padrão de TMP (500 μM). O valor encontrado na equação foi dividido pela quantidade de proteínas.

4.8.4 Proteína carbonilada

Para a dosagem de proteína carbonilada 100 mg de tecido cerebral foram homogeneizados em 750 μL de tampão KPE (KH₂PO₄ (100mM), K₂HPO₄ (100 mM), EDTA (5,5 mM), pH 7,4). Após homogeneização as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi

coletado. 500 μL da amostra foram adicionados em um tubo juntamente com 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) (10%). O tubo foi agitado em vórtex e logo depois centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao precipitado 500 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O tubo foi agitado em vórtex e incubado a temperatura ambiente no escuro por 1 hora. Durante o período de incubação foi feita agitação em vórtex a cada 15 minutos. Em seguida, adicionou-se novamente 500 μL de TCA 10%, foi feita agitação em vórtex e a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1000 μL etanol-acetato de etila (1: 1 v/v) por duas vezes. Posteriormente o precipitado foi dissolvido em 1000 μL SDS a 6% e centrifugado novamente a 10.000 rpm por 10 min a 4°C. Foi realizada leitura da absorbância do sobrenadante utilizando o comprimento de onda de 370 nm. Os cálculos para quantificação de proteína carbonilada foram realizados utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Proteína carbonilada (nmol/mL)} = (\text{absorbância} / \epsilon) * (1000000 / \text{VA})$$

Onde: $\epsilon = 22000 \text{ M.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; VA= volume da amostra

Os resultados foram expressos como nmoles de grupos carbonil por miligrama de proteína.

4.8.5 Oxyblot

Outro método utilizado para detectar proteína carbonilada no tecido cerebral foi a técnica de oxyblot (DE FREITAS CARVALHO et al., 2019). Essa técnica também foi padronizada em nosso laboratório com esse projeto de pesquisa. Brevemente, 30 mg de tecido cerebral foram homogeneizados em 150 μL de solução de lise para células (Triton X-100 1%, Tris/HCl 100mM, Glicerol 20%, EDTA 0,2 mM, DTT 1M). Após homogeneização a amostra foi centrifugada por dez minutos, 10.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi coletado. Para calcular a quantidade de amostra que corresponderia a 30 μg de proteína foi feita a dosagem de proteínas totais. Sendo assim, 30 μg de proteínas foram derivatizadas durante 15 minutos através de uma solução que continha 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) 10 mM e ácido trifluoracético 10%. Após os 15

minutos de incubação a reação foi interrompida por uma solução neutralizante (Tris 2M, glicerol 30%). Posteriormente, a amostra derivatizada foi separada por SDS-PAGE 12%, obtendo dois géis idênticos. Corou-se o primeiro gel com Coomassie Brilliant Blue R250 e o segundo gel foi feita a transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose. Após a transferência a membrana foi bloqueada com leite em pó desnatado (Molico) e TBS/Tween20 (TBST) 0,1% por 3 horas. Em seguida, incubou-se a membrana com anticorpo anti-DNPH de coelho (1:1000) por 12 horas. A membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com TBST 0,1% após a incubação do anticorpo primário e posteriormente incubada por 1 hora com o anticorpo secundário anti coelho IgG peroxidase em cabra (1:5000). Por fim a membrana foi lavada novamente por 3 vezes durante 5 minutos com TBST 0,1% e por meio de quimiluminescência, utilizando o reagente ECL, os imunocomplexos foram visualizados. Por meio do software Quantity One (4.6.6-Bio-Rad) foi analisada a intensidade das bandas e identificada a densidade de oxidação proteica.

4.9 Dosagem de BDNF

A quantificação de BDNF foi realizada através do ensaio imunoenzimático, seguindo as recomendações do kit BDNF Total Quantikine™. Brevemente, 30 mg do hipocampo foram homogeneizados em 300 µL de PBS. Após a homogeneização foi feita a centrifugação por dez minutos, 10.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi coletado. 50 µL de amostra (diluída 6x) foram adicionados em uma placa pré-revestida com um anticorpo monoclonal específico para BDNF. A placa foi incubada sob agitação em temperatura ambiente por duas horas. Após o período de incubação cada poço da placa foi aspirado e lavado quatro vezes com tampão de lavagem. Em seguida 200 µL de um anticorpo monoclonal ligado a enzima específico para BDNF foi adicionado aos poços e a placa foi incubada sob agitação em temperatura ambiente por 1 hora. Após a incubação a placa foi lavada novamente e foi adicionado 200 µL de solução de substrato a cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos protegida da luz. Após os 30 minutos foi adicionado a cada poço 50 µL da solução de parada. As reações foram obtidas por leitura em espectrofotômetro (450nm) e correção do comprimento de onda a 570 nm.

4.10 Teste de reconhecimento de novo objeto

O teste de reconhecimento de novo objeto fundamenta-se na preferência dos roedores em explorar novos objetos em relação aos familiares (LEGER et al., 2013). Para o teste, os animais foram colocados em um aparelho de campo aberto que consistia em uma caixa de acrílico retangular medindo 33 cm de largura x 33 cm de comprimento x 20 cm de altura. O primeiro passo foi habituação, onde, o animal foi colocado no campo aberto vazio, de frente para a parede mais próxima do experimentador e ficou livre para explorar por 5 minutos. Os procedimentos da habituação foram realizados novamente 6 horas depois. 24 horas após a habituação foi feita a familiarização onde o animal foi colocado no campo aberto que continha 2 objetos idênticos em forma, tamanho e cor (A e B) posicionados a 5 centímetros das paredes. Os animais ficaram livres para explorar os objetos até quando completaram 20 segundos de exploração de ambos os objetos ou quando o período de 10 minutos terminou (ou seja, o tempo máximo da sessão). O tempo gasto na exploração de cada objeto foi registrado. Por fim, 6 horas após a etapa de familiarização foi realizada a sessão de teste onde um dos objetos foi substituído por um novo (C) diferente em forma, tamanho e cor. Novamente, os animais ficaram livres para explorar os objetos até quando completaram 20 segundos de exploração de ambos os objetos ou quando o período de 10 minutos terminou. Foi registrado o tempo que o animal explorou cada objeto. O resultado foi expresso como índice de reconhecimento e foi calculado utilizando a seguinte fórmula:
$$\frac{\text{Tempo de exploração do objeto novo} - \text{tempo de exploração do objeto familiar}}{\text{Tempo de exploração do novo objeto} + \text{tempo de exploração do objeto familiar}}$$

4.11 Teste labirinto em Y

O teste de Labirinto em Y mede a memória operacional espacial e pode ser utilizado para avaliar a memória de curto prazo em camundongos (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019). Foi utilizado um labirinto em forma de Y com três braços iguais, medindo 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm. O animal foi colocado em um dos braços do labirinto de frente para o centro e permaneceu livre para explorar o labirinto por 5 minutos. Para o teste foi

considerada a alternância espontânea que acontece quando um camundongo entra em cada um dos três braços diferentes do labirinto de forma consecutiva e sem repetições, realizando uma tríade (conjunto dos três braços – A, B, C-, sem repetições). Uma entrada de braço foi considerada quando todas as 4 patas do camundongo cruzam o limiar da zona central e o corpo e o focinho do animal estão orientados para o final do braço. Sendo assim, o resultado foi expresso em porcentagem e calculado através da seguinte fórmula: (alternações espontâneas (%) = $[(n^{\circ} \text{ alternações espontâneas} / \text{total de entradas} - 2) \times 100]$).

4.12 Teste campo aberto

Como controle da atividade motora dos animais foi realizado o teste de campo aberto. Para o teste foi utilizado um aparelho de campo aberto vazio que consistia em uma caixa de acrílico retangular medindo 33 cm de largura x 33 cm de comprimento x 20 cm de altura. Os animais foram colocados no campo aberto vazio, de frente para a parede mais próxima do experimentador e ficou livre para explorar por 5 minutos. Foi feita a gravação da exploração utilizando o software Debut Video Capture (Versão 2.6) e posteriormente a análise da locomoção dos animais utilizando o software ToxTrac (Versão 2.61).

4.13 Análise estatística

Para análise da normalidade dos dados foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov. Após a análise de normalidade, para dados paramétricos foi utilizado o teste estatístico one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. E para dados não paramétricos foi utilizado o teste estatístico de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns. Os dados obtidos foram representados como média \pm erro padrão da média para os dados paramétricos e mediana e intervalo interquartil para os dados não paramétricos. $p < 0,05$ foi considerado como valor de significância. O teste de Log-rank foi utilizado para análise estatística da sobrevida. Para realização das análises foi utilizado o software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5.1 Docking e Dinâmica Molecular

5.1.1 Docking molecular

Durante o preparo dos ligantes foi considerado apenas um protômero para a ceftriaxona em pH 7,4, com carga formal -2. Já para a doxiciclina, diversos protômeros foram gerados pelo Marvin, não havendo grande diferença de distribuição entre os dois principais estados de ionização. Assim, decidiu-se conduzir os estudos de docking utilizando dois estados de protonação, um com carga formal -1 e outro +1.

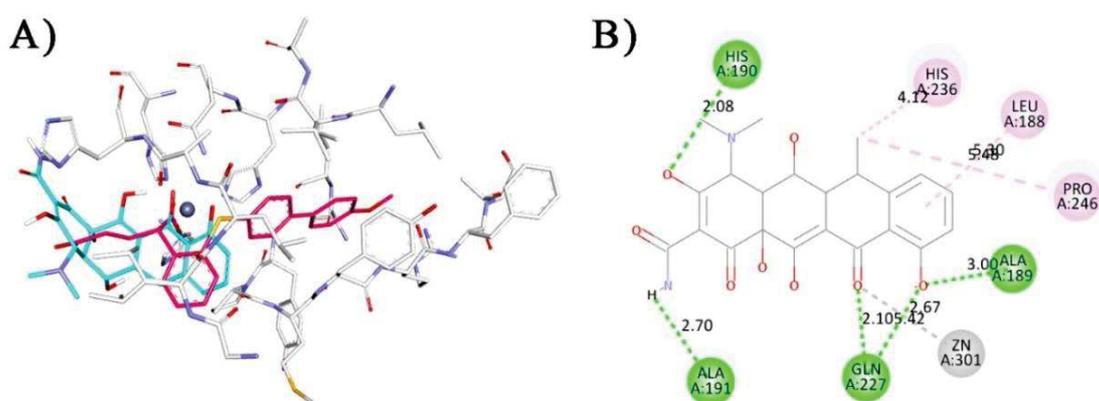
Para a validação do docking foi realizado o redocking com o ligante BE4. O redocking consiste em um experimento de docking realizado com o próprio ligante cristalográfico para avaliar a capacidade do programa em reproduzir sua pose no sítio de ligação. O GOLD conseguiu reproduzir o ligante cristalográfico com o protocolo utilizado com um RMSD de 1,40 Å. Atualmente, redocking com valores de RMSD menores do que 2,0 Å são suficientes para validar um programa de docking (HEVENER et al., 2009).

Quanto às pontuações obtidas para os ligantes, observou-se que nenhum fármaco obteve pontuação superior ao ligante cristalográfico e que a ceftriaxona foi superior aos dois protômeros da doxiciclina (Tabela 2). Como as estruturas diferem em números de átomos decidiu-se normalizar a pontuação, pois sabe-se que algumas funções de pontuação tendem a pontuar melhor ligantes maiores. Isso se deve pela presença de interações de *Van der Waals*, de caráter sempre aditivo e proporcional ao número de átomos (PAN et al., 2003). Como esses contatos dependem das superfícies expostas das duas moléculas, pode-se realizar um cálculo rápido e aproximado da área da superfície de uma molécula a partir do número de átomos diferentes de hidrogênio, bastando elevar este número a $2/3$ ($N^{2/3}$) (PAN et al., 2003). Assim, as pontuações obtidas no docking de cada ligante foram normalizadas dividindo o score por este valor calculado, no entanto, o score normalizado não alterou a posição relativa dos ligantes (Tabela 2).

Tabela 2 - Pontuação obtida pelos ligantes no docking

	Doxiciclina (-1)	Doxiciclina (+1)	Ceftriaxona	BE4 (redocking)
Score ChemPLP	59,84	64,58	89,47	144,71
Score normalizado	5,94	6,41	8,21	14,99

No entanto, não se descarta a possibilidade de atuação dos ligantes analisados na MMP-9, uma vez que eles foram preditos no sítio catalítico realizando interações importantes com o receptor, sobretudo para doxiciclina (-1) e ceftriaxona que foram capazes de estabelecer interações com o íon zinco. Foram analisadas as melhores poses de cada ligante comparando com a conformação do ligante cristalográfico no complexo para fins de referência. Enquanto a doxiciclina manteve-se dentro do sítio catalítico, a ceftriaxona, por ser um ligante mais volumoso, teve a parte do anel tiazólico em região fora do sítio ativo. Entre os dois protômeros da doxiciclina, observou-se que a molécula com carga formal -1, contendo um fenóxido em sua estrutura, possui mais pontos de interação do que a doxiciclina +1, incluindo uma interação com o átomo de zinco, importante no mecanismo de catálise das metaloproteínas (NOSRATI et al., 2019). As melhores poses preditas pelo docking, bem como as interações estabelecidas com a proteína são descritas a seguir (Figuras 11,

Figura 11 – Pose predita pelo docking da doxiciclina (-1)

12 e 13).

(A) Complexo da MMP-9 com a doxiciclina (-1) (em ciano) e com o ligante cristalográfico (em rosa) predito pelo docking. (B) Principais interações do complexo MMP-9 e doxiciclina (-1). Em

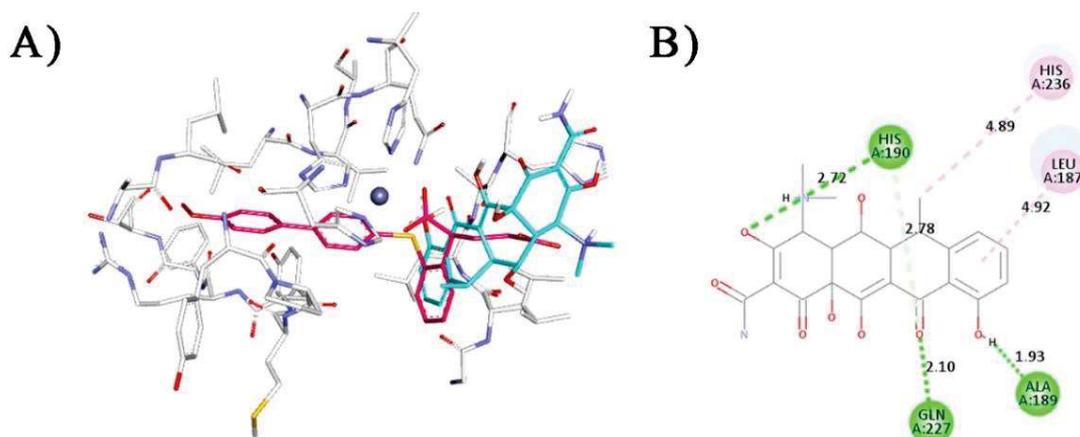
verde ligações de hidrogênio, em rosa interações hidrofóbicas e em cinza interações com metais. Distâncias reportadas em angstroms.

Na Figura 11 observa-se que o hidrogênio do grupo amida atua como doador de ligação de hidrogênio e interage com o resíduo Ala191 (2,70 Å) e o oxigênio do enol do sistema tricarbonilmetano interage com o resíduo His190 por ligação de hidrogênio (2,08 Å). A carbonila vizinha ao anel aromático atua como receptora de ligação de hidrogênio interagindo com o resíduo Gln227 (2,10 Å), participando também de uma interação com o zinco (5,42 Å).

O fenolato atua como acceptor de ligação de hidrogênio, interagindo com os resíduos Gln227 (2,67 Å) e Ala189 (3,00 Å). Por fim, o anel benzênico, assim como a metila, faz interações hidrofóbicas com o resíduo Leu188 e com os resíduos His236 e Pro246, respectivamente.

Quando comparando com a doxiciclina (-1), observa-se que parte da estrutura da doxiciclina (+1) se manteve fora do sítio ativo, perdendo a interação do grupo amida, além de não realizar interação com o zinco (Figura 12). A carbonila vizinha ao anel aromático continuou atuando como acceptora de ligação de hidrogênio interagindo com o resíduo Gln227 (2,10 Å) e o oxigênio do anel aromático, ainda que nesse protômero esteja protonado, estabelece uma ligação de hidrogênio com o resíduo Ala189 (1,93 Å).

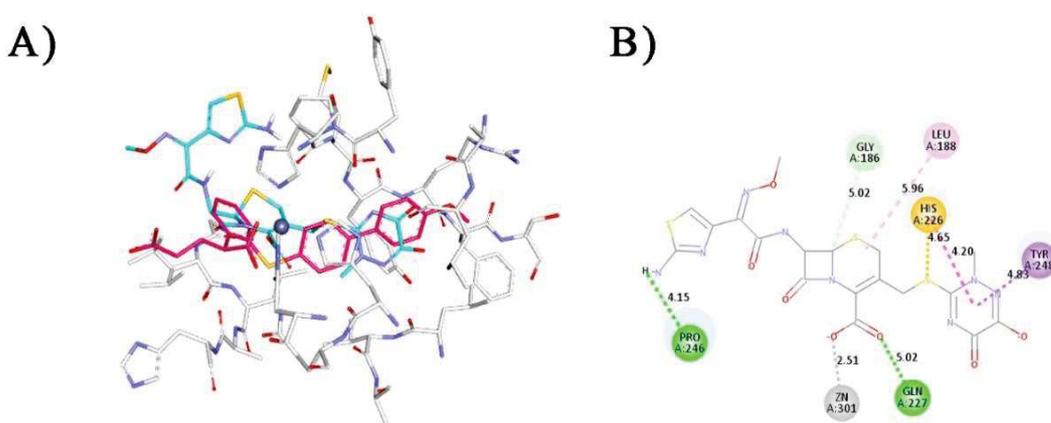
Figura 12 - Pose predita pelo docking da doxiciclina (+1)



(A) Complexo da MMP-9 com a doxiciclina (+1) (em ciano) e com o ligante cristalográfico (em rosa) predito pelo docking. (B) Principais interações do complexo MMP-9 e doxiciclina (+1). Em verde ligações de hidrogênio e em rosa interações hidrofóbicas. Distâncias reportadas em angstroms.

Por fim, a ceftriaxona, devido ao seu maior tamanho, teve parte de sua estrutura predita fora do sítio catalítico, em região mais exposta ao solvente (Figura 13). Assim, somente a amina do anel tiazólico dessa porção da molécula interage com a MMP-9, por meio de uma ligação de hidrogênio com o resíduo Pro246 (4,15 Å). Adicionalmente, o grupo carboxilato atua como acceptor de ligação de hidrogênio, interagindo com o resíduo Gln227 (5,02 Å), ao mesmo tempo em que coordena com o átomo de zinco, a uma distância de 2,51 Å. O anel triazólico está inserido em um bolso hidrofóbico formado pelos resíduos His226 e Tyr248 (4,83 Å), onde estabelece inúmeros contatos hidrofóbicos, com destaque para a interação do tipo pi-stacking com o resíduo His226 (4,20 Å). Quanto ao anel tiazolidínico, observou-se apenas uma interação hidrofóbica com o resíduo Leu188 (5,96 Å).

Figura 13 - Poses predita pelo docking da ceftriaxona



(A) Complexo da MMP-9 com a ceftriaxona (em ciano) e com o ligante cristalográfico (em rosa) predito pelo docking. (B) Principais interações do complexo MMP-9 e doxociclina (+1). Em verde ligações de hidrogênio, em rosa interações hidrofóbicas, em cinza interações com metais, em roxo interação pi-stacking e em amarelo enxofre-pi. Distâncias reportadas em angstroms.

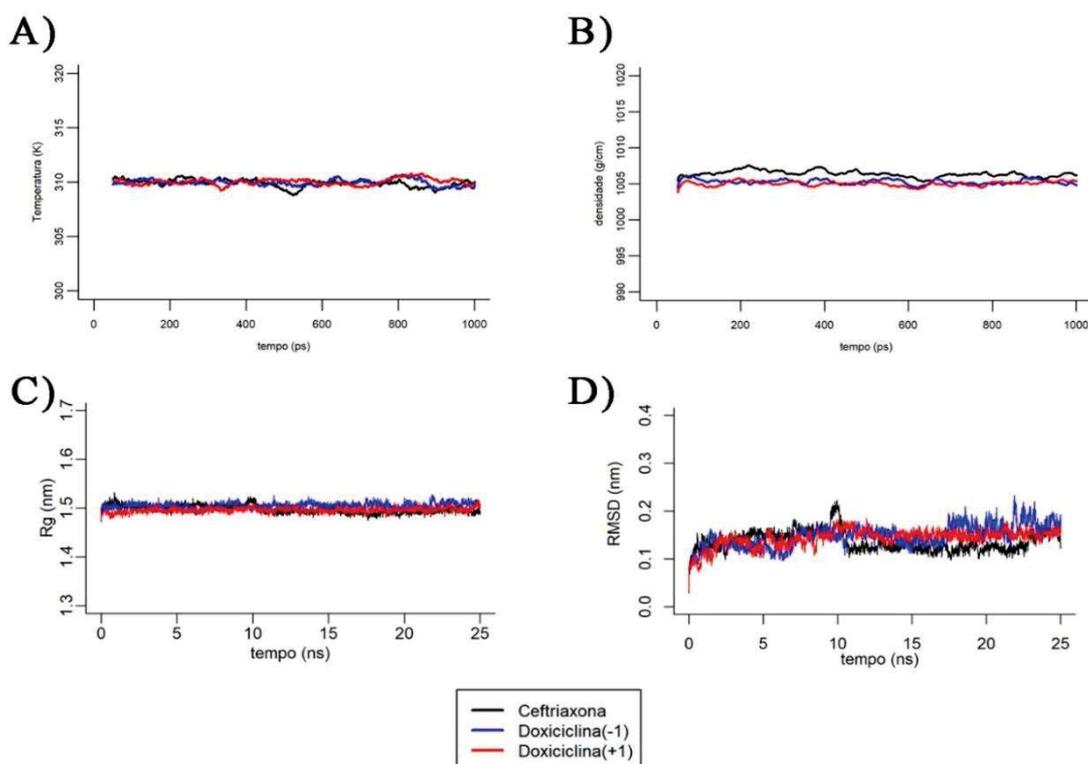
5.1.2 Dinâmica Molecular

Para realizar a dinâmica molecular com a MMP-9 se fez necessário a implementação de parâmetros de campo de força que descrevessem resíduos de histidina e aspartato coordenados ao zinco, uma vez que este está presente no sítio catalítico e é de fundamental importância na atividade das

metaloproteinases (NOSRATI et al., 2019). Essa parametrização foi implementada no campo de força Amber99sb a partir dos parâmetros descritos por Macchiagodena et al.(2019, 2020). O sistema foi solvatado com o modelo de água TIP3P e íons Na^+ e Cl^- foram adicionados a fim de neutralizar as cargas do sistema e manter uma concentração iônica do sistema em 0,15 M, que se aproxima da concentração fisiológica.

Para cada complexo, a estabilidade do sistema foi analisada durante a fase de equilíbrio observando-se a variação da densidade e temperatura do sistema, essa estabelecida em 310K (Figura 14). Além disso, durante a produção da dinâmica molecular de 25 ns, também foi analisado o raio de giro da proteína (Rg), uma medida do seu grau compactação. Em todos os casos, o Rg se manteve estável, mostrando que não houve uma tendência de desnaturação da proteína (Figura 14). O RMSD dos átomos da cadeia principal da proteína nos complexos foi calculado no decorrer da simulação e demonstrou que a dinâmica molecular produziu uma simulação estável de 25 ns em todos os casos (Figura 14).

Figura 14 - Estabilidade do sistema durante a fase de equilíbrio



(A) Média móvel (50 ps) da temperatura do sistema durante a equilibração em condições NVT.

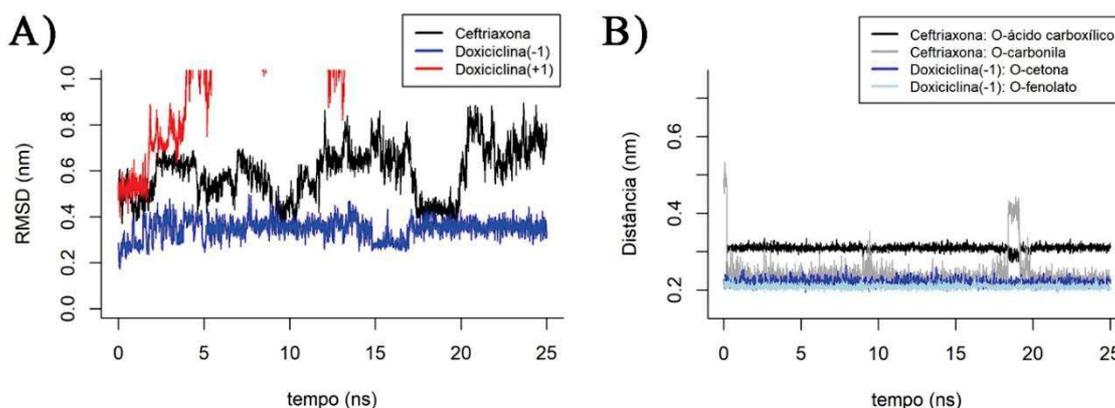
(B) Média móvel (50 ps) da densidade do sistema durante a equilibração em condições NPT.

(C) Raio de giro da proteína (Rg) durante a dinâmica molecular. (D) RMSD cadeia principal da proteína durante a dinâmica molecular.

A partir do cálculo do RMSD dos ligantes em relação a conformação inicial do docking, pode-se avaliar seu comportamento dentro dos 25 ns de simulação. Conformações são consideradas estáveis quanto menor esse desvio da conformação inicial, devido ao estabelecimento de interações importantes com receptor e esta estabilidade pode ser utilizada para validar as conformações previstas pelo docking (FERREIRA et al., 2015; SANTOS; FERREIRA; CAFFARENA, 2019).

Nos complexos avaliados observou-se que o complexo com a doxiciclina (-1) apresentou a menor variação da conformação do docking (menor do que 4 Å), com o ligante dentro do sítio catalítico durante todo tempo de simulação (Figura 15A). Esse desvio é explicado pela mudança conformacional do anel contendo o sistema tricarbonilmetano, que entra em estabilidade após 17 ns, e possibilita interações extras com a MMP-9. Já a dinâmica molecular com a doxiciclina (+1) resultou na saída do ligante do sítio catalítico logo no início da simulação (Figura 15A). Assim, conclui-se que, a estrutura inicial prevista pelo docking não foi capaz de estabelecer interações fortes o suficiente para manter a molécula no sítio catalítico. Soma-se a isso o fato de que, tanto a pose do docking quanto na DM, não há interação com o íon zinco catalítico. Já a ceftriaxona, apesar do RMSD ter variado bastante no decorrer da simulação, analisando sua trajetória observou-se que essa variação se deu na porção contendo o anel tiazólico, que se manteve fora do sítio, exposto ao solvente e com bastante liberdade de movimentação durante a simulação.

Figura 15 - RMSD dos ligantes e distâncias atômicas entre oxigênios dos ligantes e o zinco catalítico.

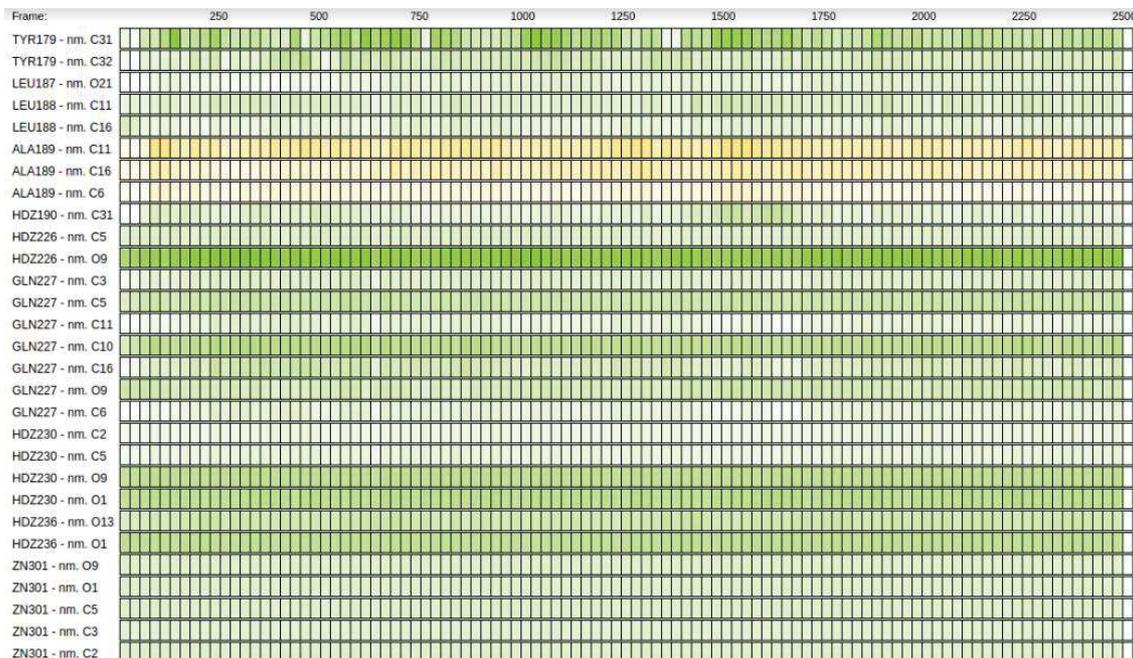


(A) RMSD dos ligantes em relação a conformação inicial do docking durante a dinâmica molecular. Para fins de clareza o gráfico foi cortado em RMSD 1,0 nm. (B) Distâncias atômicas entre oxigênios dos ligantes e o zinco catalítico.

Devido a importância do zinco no mecanismo de catálise a interação com esse metal também foi monitorada durante as simulações (Figura 15B). Na trajetória da ceftriaxona observa-se que o grupo ácido carboxílico manteve contato com o zinco, a uma distância média de 3,08 Å. No início da simulação ocorre uma mudança conformacional que permite que o oxigênio carbonílico interaja com o zinco. Essa interação é perdida temporariamente, próximo de 18 ns de simulação. Já os contatos estabelecidos com o zinco pela doxiciclina (-1) são muito mais próximos e constantes (2,18 Å e 2,08 Å, para oxigênio da cetona e do fenolato, respectivamente), indicando uma melhor coordenação com este metal e consequentemente uma maior afinidade pelo sítio de ligação.

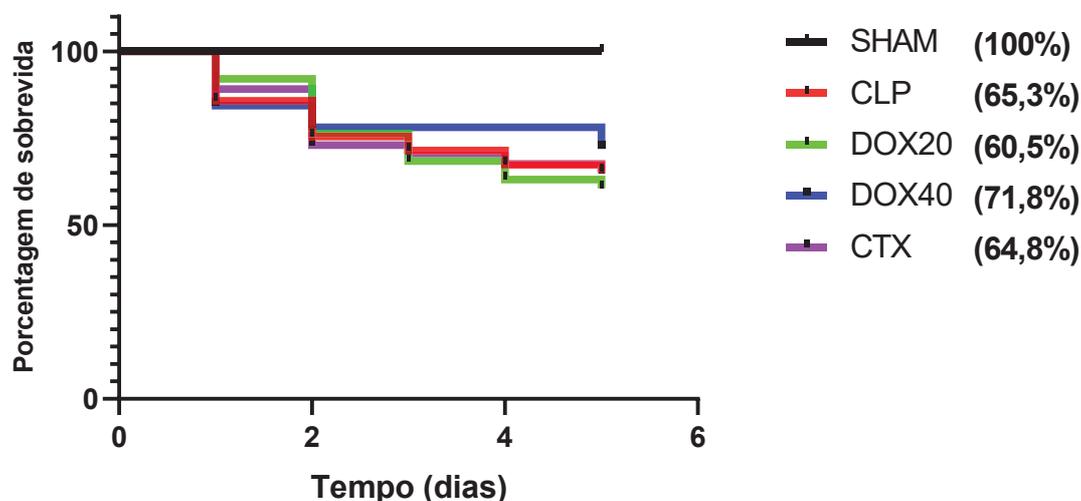
Uma análise geral das qualidades das interações estabelecidas por esses dois complexos foi realizada no PyContact e o resultado é mostrado nas Figuras 16 e 17. O PyContact é capaz de identificar os contatos entre o ligante e o receptor e analisa a qualidade de uma interação através de um score construído a partir da distância, ângulo interatômico e o tempo de contato durante a simulação (SCHEURER et al., 2018). Observa-se que as interações estabelecidas com a doxiciclina são mais constantes e de maior score, quando comparadas com a ceftriaxona. Destaca-se as interações com os resíduos de His226, His230 e His236, também responsáveis pela coordenação do zinco no sítio catalítico.

Figura 16 - Mapa de interações gerado pelo PyContact entre a MMP-9 e a doxiciclina (-1)



Cada bloco representa onde cada bloco representa 25 frames de simulação (em um total de 2500) e a intensidade da cor é proporcional a qualidade da interação entre os pares atômicos descritos a esquerda (resíduo-átomo do ligante). Blocos verdes representam interações com a cadeia lateral e amarelos com a cadeia principal do resíduo de aminoácido. HDZ representa o resíduo de histidina modificado no campo de força e ZN3001 o zinco catalítico.

Figura 18 - Curva de sobrevida dos grupos experimentais durante o período de tratamento

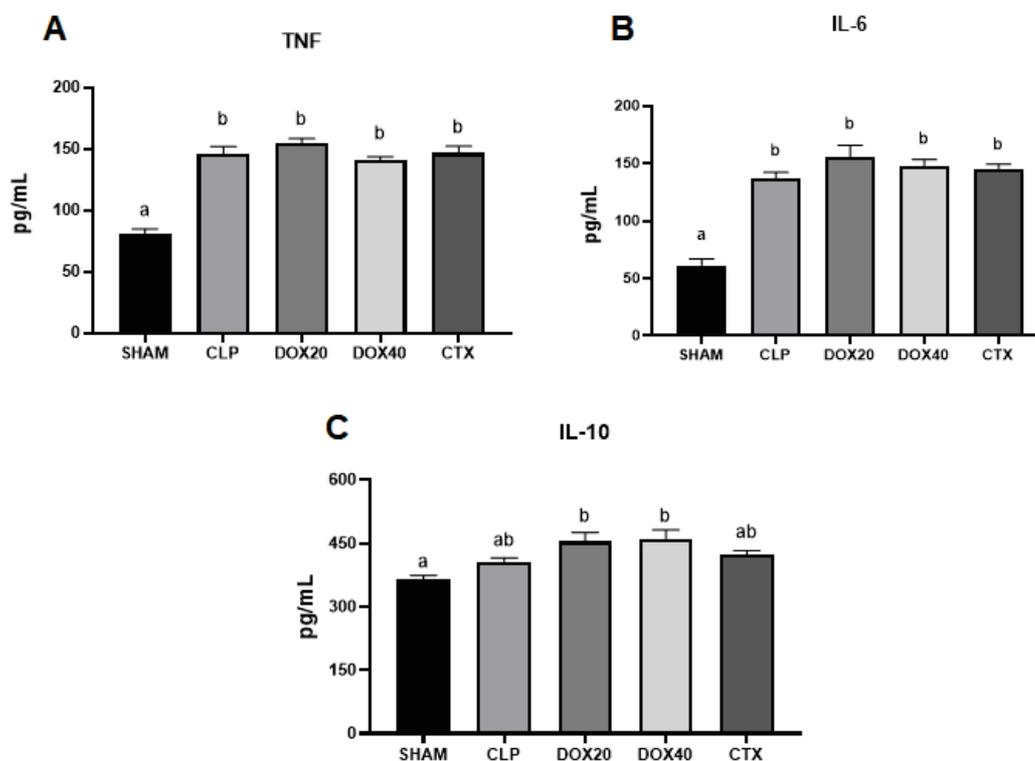


SHAM: Animais submetidos a cirurgia branca (n= 27); CLP: animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco (n= 49); DOX20: CLP tratados com doxiciclina (20 mg/kg/dia) (n= 38); DOX40: CLP tratados com doxiciclina (40 mg/kg/dia) (n= 32); CTX: CLP tratados com ceftriaxona (400 mg/kg/dia) (n= 37). A análise estatística foi avaliada pelo teste de Log-rank. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

5.3 Dosagem das citocinas séricas

Para avaliar se houve uma inflamação sistêmica provocada pela indução da sepse foi realizada a dosagem sérica dos mediadores inflamatórios TNF, IL-6 e IL-10. Conforme mostrado na figura abaixo (Figura 19), nossos resultados mostram que houve um aumento das citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-6) no soro dos animais submetidos à CLP (SHAM vs. CLP $p < 0,0001$), entretanto, o tratamento com a doxiciclina nas duas concentrações não influenciou nos níveis dessas citocinas (IL-6: CLP vs. DOX20 $p = 0,3504$; CLP vs. DOX40 $p = 0,8228$) (TNF: CLP vs. DOX20 $p = 0,6871$; CLP vs. DOX40 $p = 0,9447$). Em relação aos níveis da citocina imunoregulatória IL-10 observamos um aumento dessa citocina nos animais do grupo DOX20 e DOX40 em relação ao grupo controle SHAM (SHAM vs. DOX20 $p = 0,0015$; SHAM vs. DOX40 $p = 0,0004$).

Figura 19 - Avaliação das citocinas imunomodulatórias na sepse e nos tratamentos com doxiciclina e ceftriaxona



(A) concentração de TNF no soro; (B) concentração de IL-6 no soro; (C) concentração de IL-10 no soro. SHAM: Animais submetidos a cirurgia branca (n= 08); CLP: animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco (n= 08); DOX20: CLP tratados com doxiciclina (20 mg/kg/dia) (n= 08); DOX40: CLP tratados com doxiciclina (40 mg/kg/dia) (n= 08); CTX: CLP tratados com ceftriaxona (400 mg/kg/dia) (n= 08). A análise estatística foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey e expressos como média \pm SEM. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferenças significativas.

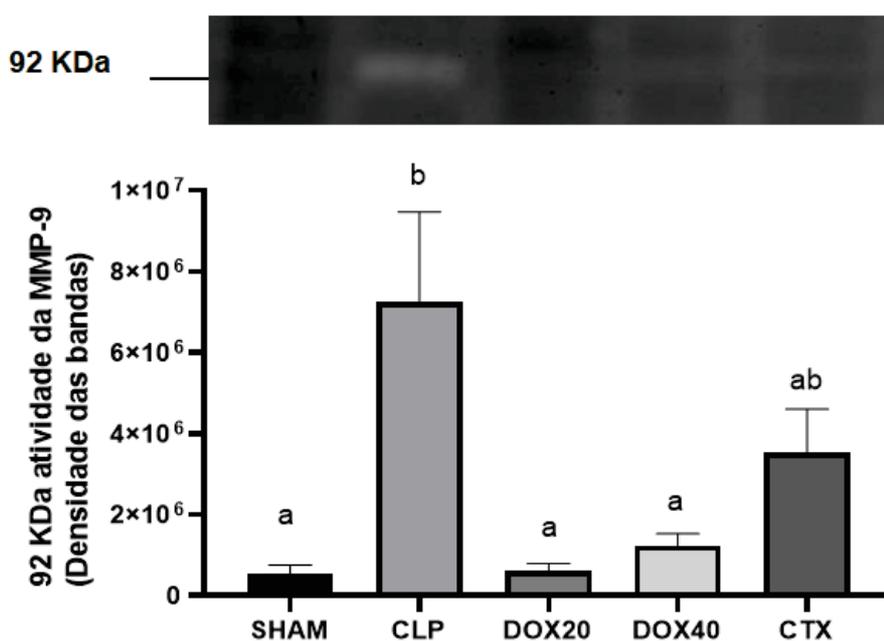
5.4 Avaliação da integridade da BHE

5.4.1 Atividade da MMP-9

Um dos mecanismos descritos da doxiciclina que podem auxiliar no reestabelecimento da integridade da BHE é a inibição de MMPs. Sendo assim, nós realizamos o teste de zimografia para avaliar a atividade de MMPs no córtex cerebral dos animais submetidos à CLP. Foi observado que houve um aumento na atividade da MMP-9 no córtex cerebral dos animais do grupo CLP

(SHAM vs. CLP $p= 0,0021$) e o tratamento com a doxiciclina na concentração de 20 mg (CLP vs. DOX20 $p= 0,0015$) e 40 mg (CLP vs. DOX40 $p= 0,0034$) foi eficaz para inibir a atividade dessa metaloproteinase, conforme figura abaixo (Figura 20). Não foi observada diferença estatística entre o grupo tratado com ceftriaxona e os demais grupos experimentais.

Figura 20 - Avaliação da atividade da MMP9 na sepse e nos tratamentos com doxiciclina e ceftriaxona



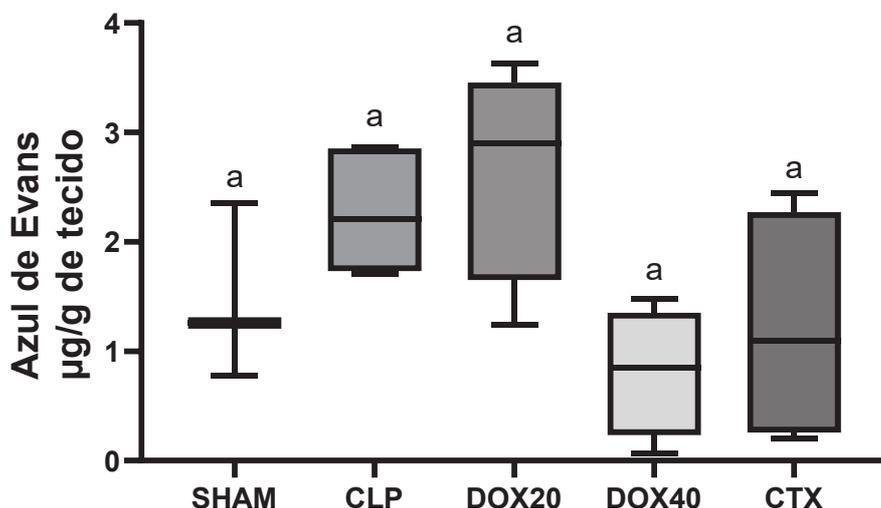
SHAM: Animais submetidos a cirurgia branca (n= 07); CLP: animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco (n= 08); DOX20: CLP tratados com doxiciclina (20 mg/kg/dia) (n= 08); DOX40: CLP tratados com doxiciclina (40 mg/kg/dia) (n= 09); CTX: CLP tratados com ceftriaxona (400 mg/kg/dia) (n= 08). A análise estatística foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey e expressos como média \pm SEM. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferenças significativas.

5.4.2 Azul de evans

Sabendo que a doxiciclina é capaz de inibir a MMP-9, nosso próximo passo foi utilizar o teste de azul de evans para avaliar a integridade da BHE.

Entretanto, não foi observado diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais, conforme figura abaixo (Figura 21):

Figura 21 - Avaliação da permeabilidade da BHE na sepse e dos tratamentos com doxiciclina e ceftriaxona



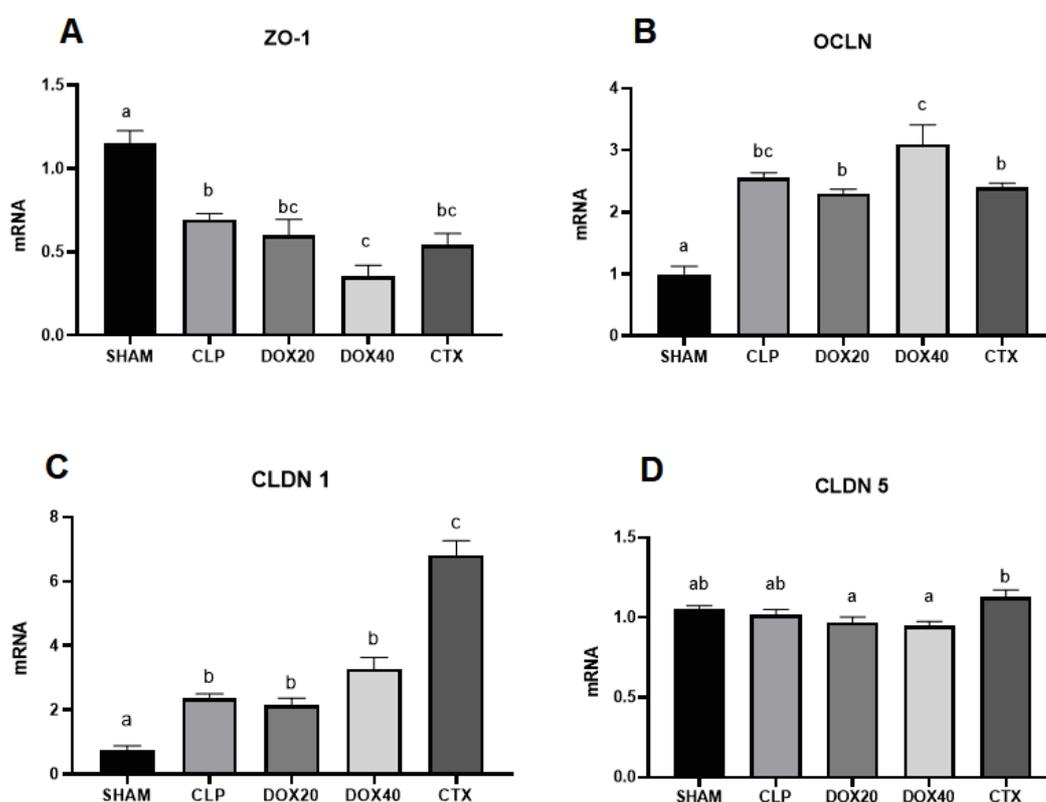
SHAM: Animais submetidos a cirurgia branca (n= 03); CLP: animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco (n= 05); DOX20: CLP tratados com doxiciclina (20 mg/kg/dia) (n= 05); DOX40: CLP tratados com doxiciclina (40 mg/kg/dia) (n= 04); CTX: CLP tratados com ceftriaxona (400 mg/kg/dia) (n= 04). A análise estatística foi avaliada pelo de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns e expressos como mediana \pm IQ. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferenças significativas.

5.4.3 Expressão gênica das proteínas da junção apertada

Sabe-se que as proteínas da junção apertada são importantes estruturas que mantêm a integridade da BHE, por isso, foi feita a análise da expressão gênica das proteínas de junção apertada ZO-1, CLDN1, CLDN5 e OCLN no córtex cerebral dos animais. Nossos resultados mostram que houve uma diminuição da expressão de ZO-1 nos animais do grupo CLP (SHAM vs. CLP $p = 0,0026$) e um aumento da expressão das proteínas CLDN 1 (SHAM vs. CLP $p = 0,0138$) e OCLN (SHAM vs. CLP $p < 0,0001$). Além disso, observamos também uma diminuição significativa da expressão de ZO-1 nos animais do grupo DOX40 (CLP vs. DOX40 $p = 0,0125$) em relação ao grupo séptico e aumento da expressão de OCLN quando comparado aos animais do grupo

DOX20 (DOX20 vs. DOX40 $p=0,0181$). Observamos também aumento na expressão dos genes CLDN 5 nos animais do grupo CTX quando comparado ao grupo DOX20 (DOX20 vs. CTX $p= 0,0209$) e ao grupo DOX40 (DOX40 vs. CTX $p= 0,0062$). E um aumento da expressão de CLDN 1 nos animais do grupo CTX quando comparado ao grupo CLP (CLP vs. CTX $p <0,0001$), DOX20 (DOX20 vs. CTX $p <0,0001$) e DOX40 (DOX40 vs. CTX $p <0,0001$), conforme figura mostrada abaixo (Figura 22):

Figura 22 - Avaliação da expressão gênica das proteínas de junção apertada na sepse e dos tratamentos com doxiciclina e ceftriaxona

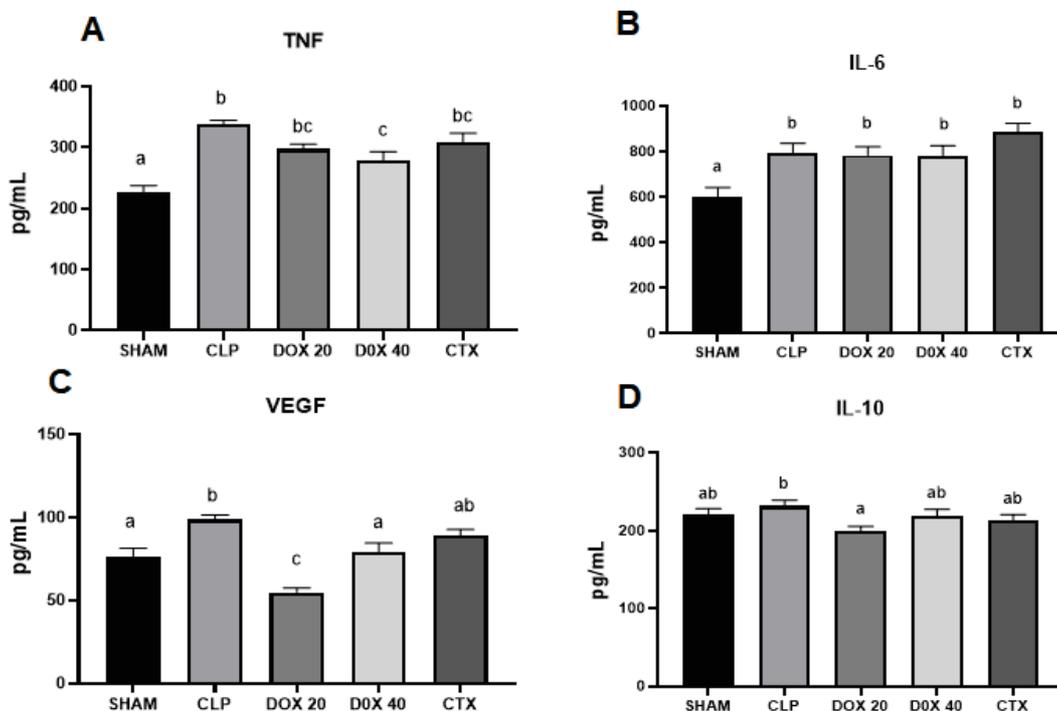


(A) Efeito dos tratamentos na expressão gênica de ZO-1; (B) Efeito dos tratamentos na expressão gênica OCLN; (C) Efeito dos tratamentos na expressão gênica de CLDN 1; (D) Efeito dos tratamentos na expressão gênica de CLDN 5. SHAM: Animais submetidos a cirurgia branca (n= 06); CLP: animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco (n= 08); DOX20: CLP tratados com doxiciclina (20 mg/kg/dia) (n= 08); DOX40: CLP tratados com doxiciclina (40 mg/kg/dia) (n= 08); CTX: CLP tratados com ceftriaxona (400 mg/kg/dia) (n= 08). A análise estatística foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey e expressos como média ± SEM. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferenças significativas.

5.5 Avaliação da neuroinflamação

Quando ocorre o dano na BHE, há um aumento da inflamação com liberação de citocinas no tecido cerebral. Portanto, para avaliar a neuroinflamação foi feita a dosagem das citocinas TNF, IL-6, VEGF e IL-10 no córtex cerebral. Nossos resultados mostram que houve um aumento de TNF (SHAM vs. CLP $p < 0,0001$), IL-6 (SHAM vs. CLP $p = 0,0253$) e VEGF (SHAM vs. CLP $p = 0,0111$) no córtex cerebral dos animais do grupo CLP. O tratamento com a doxiciclina foi eficaz para reduzir os níveis de TNF na concentração de 40 mg (CLP vs. DOX 40 $p = 0,0164$), e reduzir níveis de VEGF na concentração de 20 mg (CLP vs. DOX 20 $p < 0,0001$) e 40 mg (CLP vs. DOX 40 $p = 0,0330$). Além disso, os níveis de VEGF foram maiores nos animais do grupo DOX40 e CTX quando comparado aos animais do grupo DOX20 (DOX 20 vs. DOX 40 $p = 0,0073$; DOX 20 vs. CTX $p = 0,0001$). Observamos também que houve uma redução da IL-10 nos animais do grupo DOX20 (CLP vs. DOX 20 $p = 0,0395$), conforme figura mostrada abaixo (Figura 23):

Figura 23 - Avaliação dos mediadores inflamatórios na sepse e o efeito dos



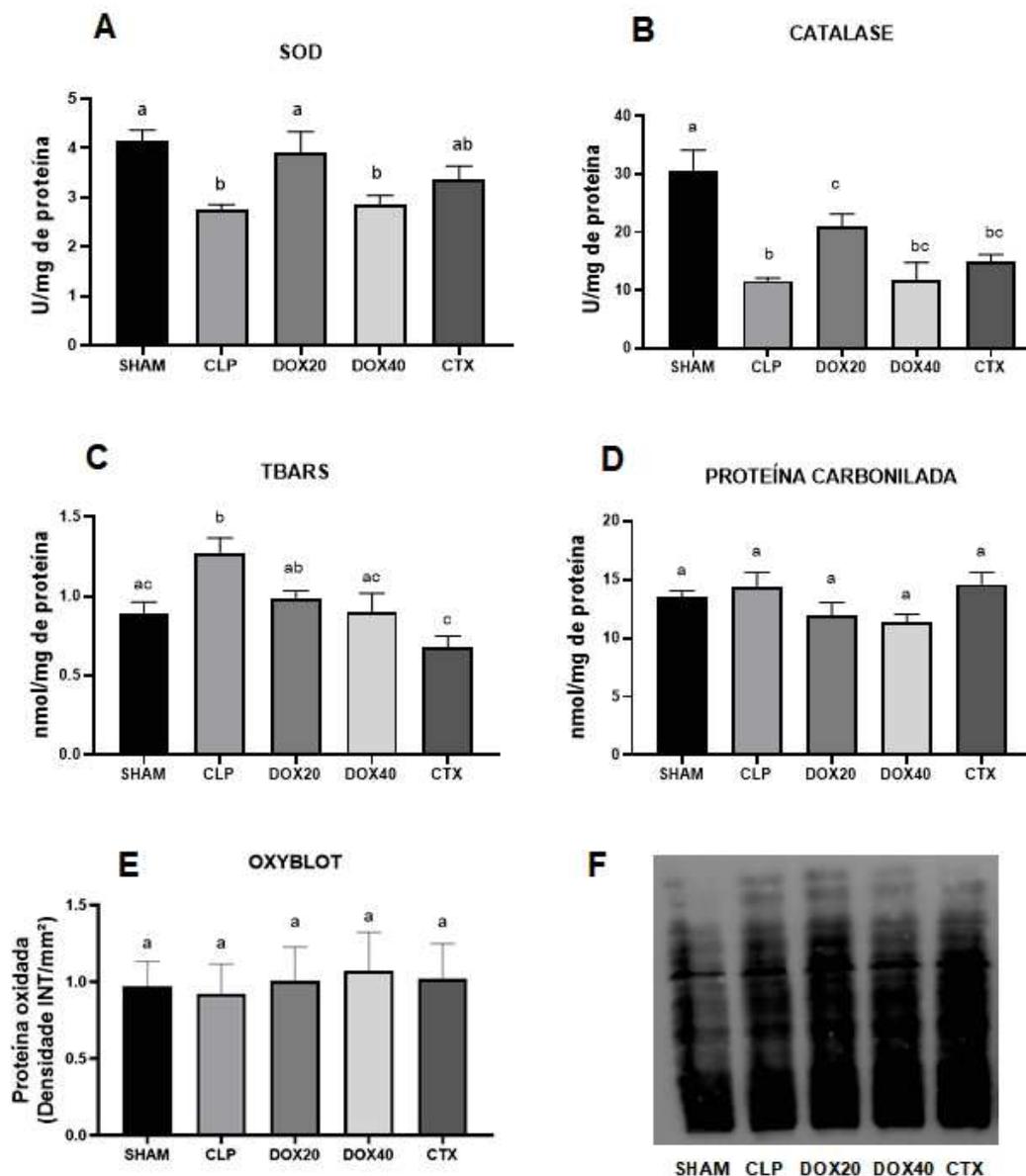
(A) concentração de TNF no córtex cerebral; (B) concentração de IL-6 no córtex cerebral; (C) concentração de VEGF no córtex cerebral; (D) concentração de IL-10 no córtex cerebral. SHAM: Animais submetidos a cirurgia branca (n= 08); CLP: animais submetidos a cirurgia de

perfuração do ceco (n= 08); DOX20: CLP tratados com doxiciclina (20 mg/kg/dia) (n= 08); DOX40: CLP tratados com doxiciclina (40 mg/kg/dia) (n= 08); CTX: CLP tratados com ceftriaxona (400 mg/kg/dia) (n= 08). A análise estatística foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey e expressos como média \pm SEM. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferenças significativas.

5.6 Avaliação do perfil redox

Durante a sepse pode ocorrer também o desequilíbrio redox que também pode contribuir para o aumento da neuroinflamação e perda da integridade da BHE. Então, para avaliar o perfil redox foram realizadas as dosagens da atividade das enzimas antioxidantes, SOD e catalase, e a dosagem dos biomarcadores de dano oxidativo, TBARS e proteína carbonilada, no córtex cerebral dos animais. Nossos resultados mostram que houve uma redução da atividade da SOD (SHAM vs. CLP $p = 0,0034$) e catalase (SHAM vs. CLP $p < 0,0001$) no córtex cerebral dos animais do grupo CLP. A doxiciclina foi eficaz em aumentar a atividade dessas enzimas na concentração de 20 mg (SOD: CLP vs. DOX20 $p = 0,0245$; Catalase: CLP vs. DOX20 $p = 0,0467$). Foi observada também uma diminuição nos níveis de SOD nos animais do grupo DOX 40 quando comparado com o grupo DOX20 (DOX20 vs. DOX40 $p = 0,0394$). Em relação aos biomarcadores de dano oxidativo foi observado um aumento na concentração de TBARS no córtex cerebral dos animais do grupo CLP (SHAM vs. CLP $p = 0,0243$) e a doxiciclina na concentração de 40 mg (CLP vs. DOX40 $p = 0,0357$) foi eficaz em diminuir as concentrações desse biomarcador. Além disso, observamos também uma diminuição nos níveis de TBARS nos animais do grupo CTX quando comparado aos grupos CLP e DOX20 (CLP vs. CTX $p = 0,0001$; DOX20 vs. CTX $p = 0,0401$). A cirurgia CLP e o tratamento com doxiciclina não influenciaram os níveis de proteína carbonilada nos dois métodos realizados nesse trabalho ($p > 0,05$), conforme figura mostrada a seguir (Figura 24):

Figura 24 Avaliação do perfil redox cerebral na sepse e do tratamento com doxiciclina e ceftriaxona

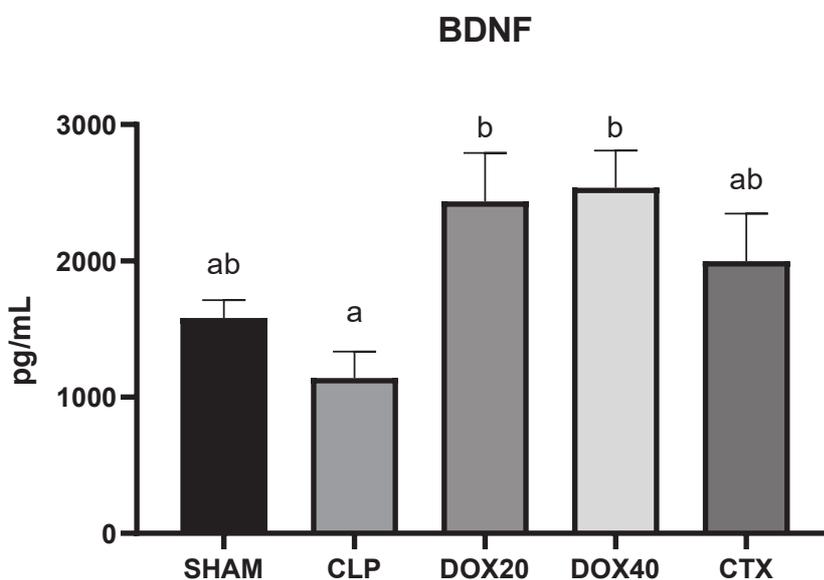


(A) atividade da SOD no córtex cerebral; (B) atividade da Catalase no córtex cerebral; (C) concentração de TBARS no córtex cerebral; (D) concentração de Proteína Carbonilada no córtex cerebral; (D) concentração de Proteína Carbonilada no córtex cerebral pelo método de oxyblot; (F) Imagem do filme representando o oxyblot. SHAM: Animais submetidos a cirurgia branca (n= 08); CLP: animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco (n= 08); DOX20: CLP tratados com doxiciclina (20 mg/kg/dia) (n= 08); DOX40: CLP tratados com doxiciclina (40 mg/kg/dia) (n= 08); CTX: CLP tratados com ceftriaxona (400 mg/kg/dia) (n= 08). A análise estatística foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey e expressos como média \pm SEM. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferenças significativas.

5.7 Avaliação dos níveis de BDNF no hipocampo

O BDNF é capaz de regular diversos processos celulares que estão relacionados com o desenvolvimento e manutenção da função cerebral normal (COLUCCI-D'AMATO; SPERANZA; VOLPICELLI, 2020). Nossos resultados mostram que o tratamento com a doxiciclina aumentou os níveis de BDNF no hipocampo dos animais na concentração de 20 mg (CLP vs. DOX20 $p= 0,0357$) e 40 mg (CLP vs. DOX40 $p= 0,0258$), conforme mostrado na figura abaixo (Figura 25):

Figura 25 - Avaliação dos níveis de BDNF hipocampal na sepse e seu efeito nos tratamentos com doxiciclina e ceftriaxona



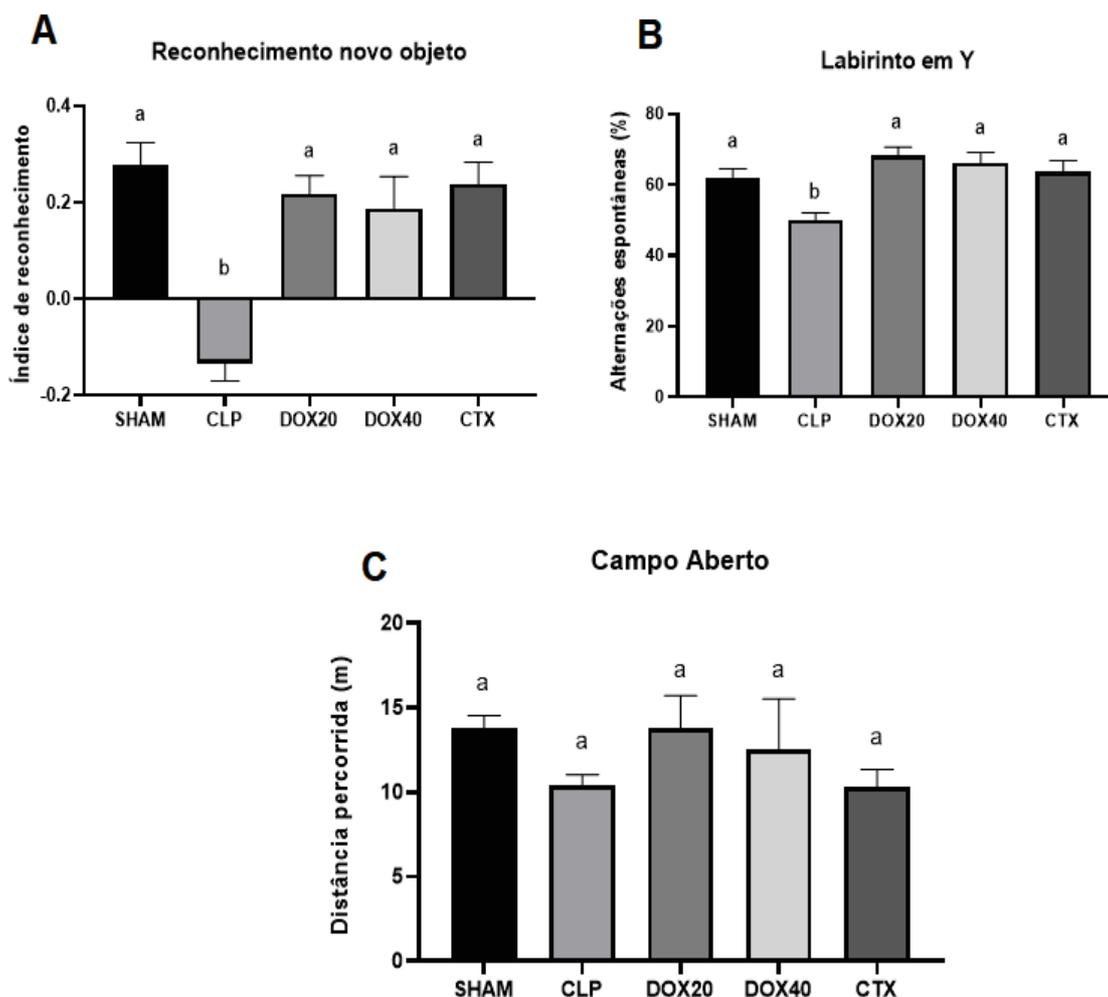
SHAM: Animais submetidos a cirurgia branca (n= 06); CLP: animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco (n= 06); DOX20: CLP tratados com doxiciclina (20 mg/kg/dia) (n= 08); DOX40: CLP tratados com doxiciclina (40 mg/kg/dia) (n= 07); CTX: CLP tratados com ceftriaxona (400 mg/kg/dia) (n= 08);. A análise estatística foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey e expressos como média \pm SEM. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferenças significativas.

5.8 Análise das funções cognitivas e comportamentais

Para avaliar se o tratamento com a doxiciclina influenciou o desempenho cognitivo dos animais foram realizados os testes de reconhecimento de novo

objeto e labirinto em Y. Nossos resultados mostram que houve uma piora da cognição dos animais do grupo CLP, tanto no teste de reconhecimento de novo objeto (SHAM vs. CLP $p < 0,0001$) quanto no teste de labirinto em Y (SHAM vs. CLP $p = 0,0308$). O tratamento com a doxiciclina foi eficaz para melhorar a cognição dos animais na concentração de 20 mg (TRO: CLP vs. DOX20 $p < 0,0001$; Labirinto em Y: CLP vs. DOX20 $p = 0,0001$) e 40 mg (TRO: CLP vs. DOX40 $p = 0,0001$; Labirinto em Y: CLP vs. DOX40 $p = 0,0009$) nos dois testes. Além disso, também foi observada uma melhora da cognição dos animais do grupo CTX em ambos os testes (TRO: CLP vs. CTX $p < 0,0001$; Labirinto em Y: CLP vs. CTX $p = 0,0044$). Foi realizado também o teste de campo aberto que foi utilizado como controle da atividade locomotora dos animais. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre a locomoção dos animais dos diferentes grupos experimentais no teste de campo aberto ($p = < 0,05$), conforme figura mostrada a seguir (Figura 26):

Figura 26 - Análise das funções cognitivas e comportamentais na sepse e do tratamento com doxiciclina e ceftriaxona



(A) Efeito dos tratamentos na cognição dos animais no teste de reconhecimento de novo objeto; (B) Efeito dos tratamentos na cognição dos animais no teste de labirinto em y; (C) Efeito dos tratamentos no teste de campo aberto. SHAM: Animais submetidos à cirurgia branca (n= 13); CLP: animais submetidos à cirurgia de perfuração do ceco (n= 15); DOX20: CLP tratados com doxiciclina (20 mg/kg/dia) (n= 13); DOX40: CLP tratados com doxiciclina (40 mg/kg/dia) (n= 12); CTX: CLP tratados com ceftriaxona (400 mg/kg/dia) (n= 14). A análise estatística foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey e expressos como média \pm SEM. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferenças significativas.

6 DISCUSSÃO

A sepse possui alta taxa de mortalidade e também pode deixar sequelas, como o déficit cognitivo. Um dos mecanismos relacionados ao comprometimento cognitivo na sepse é o aumento na atividade das MMPs. A doxiciclina é um antibiótico, mas também possui capacidade de inibir MMPs, além de possuir atividades imunomoduladoras, como efeitos anti-inflamatórios, eliminação de EROs e proteção contra a disfunção mitocondrial. Nessa pesquisa, a doxiciclina foi capaz de inibir a MMP-9, reduzir a neuroinflamação, aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, reduzir o dano oxidativo lipídico, aumentar níveis de BDNF e melhorar a cognição dos animais sépticos.

Inicialmente, foi realizado um estudo de modelagem molecular utilizando o docking e a dinâmica molecular para compreendermos melhor o possível modo de interação da ceftriaxona e da doxiciclina com a MMP-9. Como o docking molecular possui algumas limitações, como por exemplo, tratar a proteína como um corpo rígido, a ausência de um modelo de solvatação e a limitação da própria função de pontuação (FERREIRA et al., 2015), a dinâmica molecular também foi realizada em nosso trabalho, a fim de validar os resultados do docking e analisar a dinâmica de interação desses ligantes com a MMP-9. A dinâmica molecular consiste em uma técnica computacional onde ocorre a simulação de um sistema molecular através da integração numérica das equações fundamentadas nos princípios da mecânica clássica. Um conjunto de átomos podem ser descritos por forças newtonianas, onde há um campo de força em que as partículas interagem entre si. A energia potencial desse sistema é calculada e utilizada para determinar as velocidades dos átomos do sistema. Assim, a velocidade de cada átomo determinará sua posição em uma etapa seguinte, normalmente espaçadas na escala de fentosegundos. O processo se repete quantas vezes necessárias para atingir o tempo desejado de simulação (DE VIVO et al., 2016).

Nossos resultados *in silico* mostraram que a doxiciclina interagiu de maneira mais efetiva com a MMP-9 do que a ceftriaxona, tendo, assim, o potencial de ser um inibidor mais potente. Semelhante ao nosso trabalho, Robinson et al. (2022) demonstrou que o sítio ativo da MMP-9 faz fortes interações com a doxiciclina de uma maneira termodinamicamente favorável e

em seu trabalho o tratamento com a doxiciclina na concentração de 20 mg/kg por via intravenosa em camundongos C57BL/6 submetidos a traumatismo cranioencefálico foi eficaz em inibir a MMP-9 no tecido cerebral desses animais. Essas observações sugerem que a evidência experimental da inibição de MMP-9 por meio da quelatação de íons Zn^{2+} seja verdadeira.

Na segunda parte do desenvolvimento desta pesquisa, durante os 5 dias do delineamento experimental, os animais foram acompanhados duas vezes ao dia para o registro da mortalidade. Foi observado que a doxiciclina e a ceftriaxona não influenciaram a mortalidade dos animais tratados. Patel et al. (2020) também não observou influência do tratamento com a doxiciclina na mortalidade. Em seu estudo, foi observado que camundongos suíços albinos fêmeas submetidos a CLP tratados com a doxiciclina na concentração de 50 mg/kg por via intraperitoneal apresentaram taxa de sobrevivência de apenas 25%. O controle da infecção é um ponto crucial para a sobrevivência na cirurgia CLP. A doxiciclina é um antimicrobiano, porém com efeitos bacteriostáticos, o que pode não ser suficiente para o controle da infecção ocasionada pela cirurgia CLP. No estudo de Patel et al. (2020) o tratamento com doxiciclina (50 mg/kg) em combinação com a ceftriaxona não foi eficaz em diminuir a contagem bacteriana no sangue dos animais em comparação ao grupo tratado somente com ceftriaxona, sugerindo que, pelo fato da doxiciclina apresentar efeito apenas bacteriostático, ela não consegue controlar a infecção. Em nosso estudo não foi realizada a contagem bacteriana, então não pudemos avaliar se a doxiciclina conseguiu ou não controlar a infecção. Outro fator que também pode ter contribuído para que os tratamentos não melhorassem a sobrevivência dos animais foi o tempo entre a indução da sepse e o início do tratamento com os antibióticos (24 horas após a cirurgia). Sabe-se que a tempestade de citocinas atinge seu pico 6 horas após a indução da sepse por meio da cirurgia CLP (RUIZ et al., 2016; SJAASTAD et al., 2020). Assim, o início do tratamento após 24 horas pode ter influenciado a mortalidade. Entretanto, vale destacar que o nosso objetivo não foi conter a infecção bacteriana, mas sim avaliar o efeito da doxiciclina na possível melhora cognitiva dos animais pelos seus efeitos adicionais, como: (1) inibição de metaloproteinases (ANTONIO et al., 2014), (2) atividade anti-inflamatória e antioxidante (CLEMENS et al., 2018) e, (3) possível neuroprotetor (SINGH;

KHANNA; KALRA, 2021). Assim, devido às suas ações pleiotrópicas, ela pode ser considerada um alvo terapêutico interessante para modular as vias neuro inflamatórias e oxidativas, podendo contribuir para a neuro proteção e melhora cognitiva na sepse.

Sabe-se que o reconhecimento de PAMPS e DAMPS pelos PRRs pode ativar diversas vias de sinalização intracelular que culminam na expressão de genes de ativação precoce, tais como, citocinas associadas à inflamação (YANG et al., 2022; ZHANG; NING, 2021), contribuindo então para uma tempestade de citocinas, que pode desencadear uma inflamação sistêmica e causar danos aos tecidos, levando a uma disfunção orgânica (JARCZAK; NIERHAUS, 2022). Estudos recentes mostram que as citocinas TNF e IL-6 estão aumentadas no início da sepse e estão relacionadas com a regulação e progressão da sepse (MACIEL et al., 2019; PATEL et al., 2020; SEKINO; SELIM; SHEHADAH, 2022). Em nosso trabalho foi observado que os animais submetidos a CLP apresentaram um aumento nos níveis das citocinas séricas, TNF e IL-6, sugerindo que a cirurgia induziu uma tempestade de citocinas, entretanto, o tratamento com a doxiciclina e ceftriaxona não foi eficaz em diminuir esses níveis. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que a doxiciclina e a ceftriaxona não conseguiram melhorar a sobrevivência dos animais tratados, sugerindo que os antibióticos não foram eficazes para controlar a inflamação sistêmica.

Durante a sepse as respostas inflamatórias e anti-inflamatórias acontecem concomitantemente (VAN DER POLL; SHANKAR-HARI; WIERSINGA, 2021). A IL-10 possui características anti-inflamatórias e é responsável por diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas por células ativadas, podendo então agir de forma regulatória durante a tempestade de citocinas na sepse (DE SOUZA STORK et al., 2022; DELLA GIUSTINA et al., 2020). No estudo de Jensen et al. (2021) células murinas *Natural Killer* (NK), através da produção de IL-10, favoreceram a sobrevivência do hospedeiro durante a sepse, limitando a duração da tempestade de citocinas por meio da sua ação regulatória. Em nosso estudo não encontramos diferenças estatísticas nos níveis de IL-10 entre os grupos SHAM e CLP, sugerindo que no período em realizamos a dosagem (cinco dias após a cirurgia), a fase predominante no grupo CLP era a pró-inflamatória, uma

vez que observamos aumento das citocinas TNF e IL-6 nesse grupo. Entretanto, observamos um aumento de IL-10 nos grupos tratados com a doxiciclina, sugerindo que, possivelmente, o aumento dessa citocina aconteceu para compensar parcialmente o aumento das citocinas pró-inflamatórias e favorecer a resolução da inflamação.

Para avaliar a integridade da BHE foi realizada a dosagem da atividade da MMP-9, ensaio de azul de evans e expressão gênica das proteínas de junção apertada.

Em uma situação de homeostase as MMPs são produzidas em quantidades reduzidas ou então não são produzidas, entretanto, citocinas, quimiocinas, EROs e ERNs podem levar ao aumento da produção de MMPs. Durante a patogênese da sepse, esses fatores estão aumentados, levando então ao aumento da produção e secreção de MMPs (DE ALMEIDA et al., 2022). Em nosso trabalho observamos aumento de citocinas no soro e no tecido cerebral, além de desregulação do perfil redox no tecido cerebral sugerindo que esses mecanismos levaram ao aumento da atividade da MMP-9 nos animais submetidos à CLP. O aumento de MMPs pode favorecer a perda da integridade da BHE. Estudos mostram que a MMP-9 pode clivar as proteínas de junção apertada, que são essenciais para a integridade da BHE. No estudo de Dal-Pizzol et al. (2013), eles observaram que a MMP-9 nos microvasos do hipocampo e do córtex estava aumentada em ratos Wistar submetidos à CLP e esse aumento de MMP-9 foi relacionada com o aumento da permeabilidade da BHE.

Estudos demonstram que a doxiciclina pode inibir MMPs por meio do efeito quelante dos íons Zn^{2+} e Ca^{2+} , que são essenciais para a atividade enzimática e também por regulação negativa da transcrição das MMPs (NUKARINEN et al., 2015; SAUER; PUTENSEN; BODE, 2022). Em nosso estudo, a doxiciclina nas duas concentrações foi eficaz em inibir a MMP-9 no córtex cerebral dos animais submetidos à CLP. Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Robinson et al. (2022) onde o tratamento com doxiciclina na concentração de 20 mg/kg por via intravenosa foi eficaz em inibir a MMP-9 no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 submetidos a traumatismo cranioencefálico. O tratamento com a ceftriaxona não foi eficaz em

inibir a MMP-9, corroborando com os resultados que encontramos em nosso estudo de modelagem molecular e na literatura (RICCI et al., 2020).

Em nosso estudo não observamos diferenças significativas entre os grupos experimentais na avaliação da integridade da BHE pelo teste de azul de evans. Um bom marcador de perda da integridade da BHE deve ser metabolicamente inerte, não tóxico, ser disponível em tamanhos moleculares diferentes, ser visualizado macroscopicamente e em nível microscópico, ser quantificável e não deve ligar a moléculas, como proteínas teciduais e plasmáticas. Nenhum marcador que cumpra todos os critérios está disponível até o momento (KADRY; NOORANI; CUCULLO, 2020). O azul de evans é amplamente usado em estudos para avaliar a integridade da BHE. Quando ele cai na corrente sanguínea ele se liga fortemente à albumina sérica, formando um composto de alto peso molecular (69 kDa), que não consegue ultrapassar a BHE intacta (YAO et al., 2018). Entretanto, quando ocorre um comprometimento sutil da BHE o azul de evans pode não conseguir ultrapassar a BHE, sendo então uma limitação desse método.

Grande parte dos estudos que avaliam a integridade da BHE na sepse pelo método de azul de evans fazem o teste 24 horas após a cirurgia CLP (MICHELS et al., 2015; WEN et al., 2022; YANG et al., 2015), onde é o início da perda da integridade da BHE e onde provavelmente acontece o pico de inflamação e estresse oxidativo. Em nosso estudo, avaliamos a integridade da BHE 5 dias após CLP. A neuroinflamação, estresse oxidativo e alterações na atividade da MMP-9 estiveram presentes nesse estudo, entretanto, não observamos diferenças entre os grupos no teste de azul de evans, sugerindo que, em 5 dias, os animais que sobreviveram à sepse podem ter apresentado um dano menos evidente da BHE. Assim, é provável que se a eutanásia fosse realizada entre 24 e 48 horas, por exemplo, poderíamos ter observado um maior dano à BHE e possível detecção de diferenças significativas com o corante azul de evans, sendo assim, a cinética temporal é um fator importante para acompanharmos essas flutuações nas alterações cerebrais e mais estudos têm que ser realizados para avaliarmos com mais precisão o dano à BHE. Além disso, como a técnica do azul de evans nunca tinha sido feita em nosso laboratório, parte dos animais foram utilizados para padronizá-la, assim nosso n amostral, principalmente no grupo SHAM, foi pequeno (03 animais).

Em uma busca na literatura, observamos que geralmente os estudos trabalham a partir de 4 animais por grupo (BOLDEN; OLSON; COX, 2023; COMIM et al., 2011; DAL-PIZZOL et al., 2013; WANG et al., 2023; YU et al., 2020), sendo assim, esse pode ter sido outro fator que explicaria o porquê não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, já que no estudo de Wang et al. (2020) camundongos C57BL/6 submetidos à CLP, 14 dias após a cirurgia apresentaram aumento do extravasamento de azul de evans no parênquima cerebral e comprometimento cognitivo.

Em relação à expressão gênica das proteínas de junção apertada foi observado uma diminuição da expressão de ZO-1 e um aumento da expressão da OCLN e CLDN 1 nos animais do grupo submetido a CLP sem tratamento, entretanto, o tratamento com a doxíciclina não foi eficaz em aumentar a expressão dessas proteínas. Além disso, observamos um aumento da expressão de CLDN 1 no grupo CTX. Resultado semelhante ao nosso foi encontrado no estudo de Pu et al. (2022) em que camundongos C57BL/6 que receberam LPS apresentaram expressão reduzida de ZO-1. Entretanto no estudo clínico de Zhao et al. (2016), os níveis de OCLN e ZO-1 tiveram os níveis plasmáticos maiores em pacientes com sepse grave e choque séptico do que apenas sépticos.

Aumento de citocinas pró-inflamatórias, EROs, MMPs podem afetar a permeabilidade da BHE por meio da regulação negativa das proteínas de junção apertada. Em nosso estudo observamos aumento de citocinas pró-inflamatórias, dano oxidativo, aumento da atividade da MMP-9, sendo que a doxíciclina conseguiu melhorar esses fatores, entretanto não observamos efeitos na expressão das proteínas de junção apertada e no ensaio de azul de evans. Uma explicação para isso é que existem outras formas de dano na BHE que não seja pela diminuição da expressão de proteínas da junção apertada, como o vazamento por meio de vesículas, canais transcelulares ou membranas celulares endoteliais danificadas. Por isso, ao analisarmos os dados da expressão dessas proteínas temos que ser cautelosos, uma vez que a ausência de diminuição da expressão não quer dizer que a BHE esteja sem nenhuma alteração (ERICKSON; BANKS, 2018). Além disso, a expressão gênica não nos dá a informação se a proteína foi realmente traduzida e, portanto, a sua real concentração no tecido cerebral, sendo essa uma limitação

do nosso estudo. Técnicas como a de *western blotting* ou microscopia intravital nos permitiria verificar essa questão, sendo assim, mais estudos têm que ser feitos para avaliar o efeito da doxiciclina na expressão das proteínas de junção apertada.

Nesse estudo, observamos um aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-6 e VEGF nos animais submetidos à CLP mostrando que a cirurgia foi eficaz em provocar neuroinflamação. Entretanto, observamos uma diminuição de IL-10 apenas no grupo tratado com doxiciclina na concentração de 20 mg. Semelhante ao nosso trabalho Michels et al. (2019) também observou aumento das citocinas TNF e IL-6 no hipocampo em ratos submetidos à CLP. Além disso, eles não observaram diferenças nos níveis de IL-10 entre os grupos no hipocampo. Durante a sepse ocorre uma inflamação sistêmica, levando a uma tempestade de citocinas. Essas citocinas por diversos mecanismos podem acessar o SNC. Quando dentro do cérebro elas podem interagir com as células cerebrais e, conseqüentemente, promover a ativação de células endoteliais e microgliais, levando a geração de EROs, NO e ainda mais citocinas. Sendo assim, a presença da neuroinflamação pode afetar o bem-estar neuronal e glial causando um desequilíbrio na homeostase cerebral que pode favorecer o comprometimento cognitivo. Além da capacidade de inibir MMPs, alguns estudos relatam a atividade anti-inflamatória da doxiciclina (CHAVES FILHO et al., 2021; CLEMENS et al., 2018; DI CAPRIO et al., 2015; MURI et al., 2019; SAUER; PUTENSEN; BODE, 2022). Em nosso trabalho, a doxiciclina foi eficaz para diminuir os níveis de TNF e VEGF. Níveis elevados do VEGF também estão relacionados à hiperpermeabilidade, edema e dano tecidual, sendo o VEGF considerado um mediador central da permeabilidade vascular, podendo levar a patogênese de diversas doenças, inclusive a sepse (TANG et al., 2022; WANG et al., 2021b). Alguns estudos mostram que a MMP-9 também está relacionada com o aumento dos níveis de VEGF e, conseqüentemente, com o aumento na permeabilidade vascular (EBRAHEM et al., 2010). Através da degradação da matriz extracelular pelas MMPs fatores angiogênicos, como o VEGF, podem ser liberados. Entretanto, o VEGF também está relacionado com a indução da secreção de MMPs pelas células endoteliais (HADJIMICHAEL et al., 2020). Além disso, o VEGF derivado de astrócitos está relacionado com a regulação negativa da expressão das proteínas de junção apertada CLDN 5 e

OCLN, sendo outro fator que contribui para o aumento da permeabilidade da BHE (ARGAW et al., 2009; HU et al., 2022; SHAN et al., 2019). O tratamento com a ceftriaxona não afetou os níveis dos mediadores inflamatórios analisados nesse trabalho. No estudo de Muri et al. (2019) o tratamento com a ceftriaxona também não foi eficaz em reduzir os níveis de TNF e IL-6, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Durante a sepse, a resposta imune sistêmica é ativada e pode ocorrer liberação de EROs e ERNs. Nosso corpo possui defesas antioxidantes como as enzimas antioxidantes, SOD e catalase, entretanto, na sepse essas enzimas não conseguem superar a produção aumentada dessas espécies reativas, levando então ao estresse oxidativo que pode resultar em neuroinflamação, aumento da permeabilidade da BHE e isquemia, que podem favorecer o comprometimento cognitivo (BARICHELLO et al., 2021; NWAFOR et al., 2019). Em nosso estudo, a indução da sepse pela cirurgia CLP foi capaz de induzir estresse oxidativo no córtex cerebral dos animais através da diminuição da atividade da SOD e catalase e indução da peroxidação lipídica cerebral.

A peroxidação lipídica é caracterizada como um processo auto-oxidativo tendo como fator iniciante o ataque de radicais livres. Ela auxilia na morte celular por meio de danos oxidativos nas membranas celulares contribuindo, também, para danos à BHE (CHEN et al., 2019; KANG et al., 2018). O cérebro possui altas concentrações de lipídios que podem ser passíveis de oxidação. Durante a sepse, devido ao seu metabolismo elevado, o cérebro é exposto a uma quantidade elevada de espécies reativas que podem ser resultantes da neuroinflamação (ZARBATO et al., 2018). Portanto, o estresse oxidativo observado na sepse pode provocar peroxidação lipídica nas membranas celulares e essa peroxidação pode levar ao dano na composição da membrana causando o aumento da permeabilidade, danos em organelas e alteração do transporte iônico (ZHAO et al., 2022). Além disso, a peroxidação lipídica pode formar subprodutos, como o malondialdeído, que podem possuir efeitos imunogênicos, sendo responsáveis por iniciar respostas pró-inflamatórias (CLEMENS et al., 2018). A peroxidação lipídica também está relacionada com a ferroptose, que é um tipo de morte celular regulatória que também está relacionada com danos à BHE. A ferroptose acontece por causa do aumento

de EROs dependentes de ferro e peróxidos lipídicos que levam ao estresse oxidativo celular (ZHAO et al., 2022).

Em condições normais, as enzimas antioxidantes, como a SOD e catalase, conseguem manter o equilíbrio redox, entretanto, durante a sepse há um aumento exacerbado da resposta inflamatória e oxidativa e o organismo não consegue controlar, além disso, alguns estudos mostram que a produção de SOD e catalase é interrompida durante a sepse, colaborando para o aumento do estresse oxidativo e dano celular (MARGOTTI et al., 2022; ZARBATO et al., 2018). Em nosso estudo o tratamento com a doxiciclina foi capaz de aumentar a atividade dessas enzimas e diminuir a peroxidação lipídica, melhorando então o perfil redox do córtex cerebral dos animais. No estudo de Ferreira Mello et al. (2013) o tratamento com doxiciclina na concentração de 25 e 50 mg/kg por via intraperitoneal preveniu e reverteu alterações induzidas por LPS nos níveis de TBARS e glutathione em camundongos Swiss machos.

O tratamento com a ceftriaxona também foi eficaz para diminuir os níveis de TBARS. No estudo de Amin et al. (2014) o tratamento com ceftriaxona em ratos Wistar em um modelo de lesão por constrição crônica do nervo ciático também foi eficaz em diminuir a peroxidação lipídica, entretanto, esse efeito foi relacionado com a ativação do transportador de glutamato GLT 1. Durante a sepse elevadas quantidades de glutamato podem ser produzidas pela micróglia ativada e isso pode levar a excitotoxicidade nos circuitos neuronais (LI; JI; YANG, 2022), sugerindo então, que através de mecanismos diferentes da doxiciclina, a ceftriaxona foi eficiente em diminuir os níveis de TBARS nos animais sépticos.

Nos dois métodos em que avaliamos a oxidação de proteínas não encontramos diferenças entre os grupos experimentais. Alguns estudos mostram que enquanto a peroxidação lipídica é distribuída de forma ampla e consistente nas estruturas do córtex cerebral, cerebelo e hipocampo, a oxidação de proteínas está restrita ao hipocampo 6 horas após CLP (NWAFOR et al., 2019). Em nosso estudo avaliamos a oxidação de proteínas apenas no córtex cerebral dos animais. No estudo de Novochadlo et al. (2021) ratos Wistar machos submetidos à CLP aumentaram a formação de TBARS em 24 h no hipocampo e no córtex pré-frontal, em comparação com animais SHAM,

entretanto, os animais sépticos apresentaram dano a proteínas apenas no hipocampo.

A sepse pode provocar danos ao SNC e esses danos podem afetar fatores de crescimento relacionados à neuroplasticidade, como o BDNF (DELLA GIUSTINA et al., 2017). Em nosso estudo observamos que o tratamento com doxiciclina aumentou os níveis de BDNF no hipocampo, mas não encontramos diferenças entre os grupos submetidos à cirurgia branca e o CLP sem tratamento e também com o tratamento com a ceftriaxona. O BDNF é uma neurotrofina e está relacionado com a consolidação da memória. Sua produção se dá dentro dos neurônios na forma de um pró-peptídeo (proBDNF), que em seguida é clivado e forma-se o BDNF maduro. Essas duas formas possuem efeitos diferentes na função celular. O pró-BDNF pode estar associado a efeitos tóxicos como a indução da apoptose, enquanto o BDNF maduro está associado a um efeito neuroprotetor, favorecendo a sobrevivência neuronal e modulação da conectividade sináptica (PARKHURST et al., 2013; REIS; CASTRO-FARIA-NETO, 2022; TOMASI et al., 2017). Em nosso trabalho, o método utilizado para avaliar os níveis de BDNF não permite a diferenciação entre as duas formas de BDNF, sendo uma possível explicação para não haver diferenças entre os grupos SHAM e CLP, já que alguns estudos como o de De Souza Stork et al. (2022) mostraram essas alterações e no estudo de Cui et al. (2021) camundongos C57BL/6 que receberam injeção de LPS tiveram a expressão de proBDNF e seu receptor p75 NTR aumentados no hipocampo e isso foi relacionado à disfunção cognitiva. Já os níveis de BDNF e seu receptor TrkB tiveram expressão reduzida. Além disso, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo estão relacionados com a diminuição de BDNF, sendo que a diminuição da inflamação está relacionada com a reversão dessas alterações. (DE SOUZA STORK et al., 2022; DELLA GIUSTINA et al., 2017). A doxiciclina está relacionada a efeitos anti-inflamatórios e em nosso estudo ela foi capaz de diminuir os níveis de TNF e VEGF no córtex cerebral, sugerindo que o aumento dos níveis de BDNF que observamos nos grupos tratados com doxiciclina possa estar relacionado com a redução da inflamação. O tratamento com doxiciclina na concentração de 40 mg/kg por via intraperitoneal aumentou os níveis de BDNF em ratos da linhagem Wistar 6 horas após a inoculação de LPS (Er et al., 2020). No estudo de Ferreira Mello

et al. (2013) o tratamento com doxiciclina na concentração de 25 e 50 mg/kg, por via intraperitoneal, aumentou os níveis de BDNF quando comparado aos animais expostos ao LPS, entretanto, eles também não observaram diferença entre os níveis de BDNF dos animais do grupo que recebeu LPS sem tratamento em relação ao animais do grupo controle, semelhante ao observado em nosso estudo.

Diversos estudos mostram que a sepse pode provocar comprometimento cognitivo em pacientes que sobrevivem a sepse. Esse comprometimento cognitivo decorrente da sepse pode ser resultado da neuroinflamação, estresse oxidativo e aumento da permeabilidade da BHE (REIS; CASTRO-FARIA-NETO, 2022). Em nosso trabalho os animais submetidos a CLP apresentaram uma piora da cognição e a doxiciclina conseguiu melhorar o desempenho cognitivo dos animais tratados. Os animais tratados com a doxiciclina também apresentaram uma diminuição da neuroinflamação, melhora do perfil antioxidante e inibição da MMP-9. Além disso, observamos um aumento nos níveis de BDNF com o tratamento com a doxiciclina. Estes resultados analisados em conjunto sugerem que a doxiciclina por meio de seus efeitos pleiotrópicos (anti-inflamatória, antioxidante e inibidora de MMPs) é eficiente em melhorar a cognição dos animais. Não encontramos diferenças entre os grupos no teste de campo aberto, sugerindo que a cirurgia não afetou a locomoção dos animais e conseqüentemente não interferiu na interpretação dos outros testes cognitivos.

No estudo de Chaves Filho et al. (2021) o tratamento com doxiciclina nas concentrações de 25 e 50 mg/kg por via intraperitoneal foi eficaz para reverter alterações cognitivas nos testes de labirinto em Y e reconhecimento de novo objeto em um modelo de mania induzida por d-anfetamina em camundongos Swiss machos. Além de reverter o aumento induzido por d-anfetamina de TNF, mieloperoxidase e peroxidação lipídica.

Em nosso estudo, o tratamento com a ceftriaxona também foi capaz de melhorar a cognição dos animais. Alguns estudos mostram que ela pode ter efeito neuroprotetor em doenças neurodegenerativas, reduzindo a hiperatividade glutamatérgica e a excitotoxicidade por meio de mecanismos como, aumento da recaptação de glutamato e da expressão do transportador de glutamato-1, inibição da polimerização de α -syn, regulação da expressão de

genes relacionadas ao metabolismo de A β , além de recuperação da densidade neuronal e aumento da neurogênese (SUN; ARMSTRONG, 2021; TAI et al., 2019). Essas observações sugerem que os mecanismos neuroprotetores relatados para a ceftriaxona não são os mesmos do que os da doxiciclina, uma vez que em nossas análises a ceftriaxona não conseguiu reproduzir os mesmos efeitos da doxiciclina.

Portanto a indução da sepse por CLP em nosso estudo provocou um aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 no soro dos animais. No córtex cerebral induziu aumento da atividade da MMP-9, das citocinas pró-inflamatórias, TNF, IL-6 e VEGF, além do desequilíbrio redox observado pela redução da atividade das enzimas antioxidantes, SOD e catalase, e aumento do dano oxidativo lipídico. Além disso, a indução da sepse provocou piora da cognição dos animais nos dois testes realizados. O tratamento com a ceftriaxona provocou um aumento de CLDN 1, diminuição dos níveis de TBARS e melhora da cognição dos animais. Já o tratamento com a doxiciclina na dose de 20 mg/Kg foi capaz de inibir MMP-9, reduzir os níveis de VEGF e IL-10 no córtex cerebral, melhorar o perfil redox, por meio do aumento de SOD e catalase, além de aumentar os níveis de BDNF no hipocampo e melhorar a cognição dos animais. Na dose de 40 mg/Kg, o tratamento com a doxiciclina inibiu a MMP-9, reduziu expressão de ZO-1, diminuiu níveis de TNF e VEGF no córtex cerebral, melhorou o perfil redox por meio da redução de TBARS, aumentou os níveis de BDNF no hipocampo e melhorou a cognição dos animais (Tabela 3). Além disso, a doxiciclina interagiu de maneira mais efetiva do que a ceftriaxona nos estudos de modelagem molecular realizados.

Assim, a hipótese prévia à realização do estudo foi aceita à medida que a doxiciclina foi eficaz em inibir a MMP-9 e reduzir níveis de TNF e VEGF, possivelmente reduzindo o dano à BHE (este resultado ainda necessita ser confirmado), o que pode ter contribuído para a redução da neuroinflamação e do estresse oxidativo cerebral, além de aumentar os níveis de BDNF, sendo que todos esses fatores em conjunto contribuíram para a melhora cognitiva dos animais, diferentemente da ceftriaxona, que apesar de melhorar a cognição dos animais, não apresentou potencial significativo em inibir a MMP-9 e nem efeito anti-inflamatório e antioxidante.

Tabela 3 - Resumo dos resultados

PARÂMETROS	CLP (Em relação ao grupo SHAM)	DOX20 (Em relação ao grupo CLP)	DOX40 (Em relação ao grupo CLP)	CTX (Em relação ao grupo CLP)
Mortalidade	↑	----	----	----
TNF e IL-6 séricos	↑	----	----	----
IL-10 sérica	----	----	----	----
Atividade da MMP-9	↑	↓	↓	----
Azul de Evans	----	----	----	----
ZO-1	↓	----	↓	----
OCLN	↑	----	----	----
CLDN 1	↑	----	----	↑
CLDN 5	----	----	----	----
TNF cérebro	↑	----	↓	----
IL-6 cérebro	↑	----	----	----
VEGF cérebro	↑	↓	↓	----
IL-10 cérebro	----	↓	----	----
SOD	↓	↑	----	----
Catalase	↓	↑	----	----
TBARS	↑	----	↓	↓
Proteína Carbonilada	----	----	----	----
Oxyblot	----	----	----	----

BDNF	----	↑	↑	----
TRO	↓	↑	↑	↑
Labirinto em Y	↓	↑	↑	↑
Campo aberto	----	----	----	----

SHAM: Animais submetidos a cirurgia branca; CLP: animais submetidos a cirurgia de perfuração do ceco; DOX20: CLP tratados com doxiciclina (20 mg/kg/dia); DOX40: CLP tratados com doxiciclina (40 mg/kg/dia); CTX: CLP tratados com ceftriaxona (400 mg/kg/dia). Seta para cima: Aumento em relação ao grupo SHAM ou CLP; Seta para baixo: Diminuição em relação ao grupo SHAM ou CLP; Quatro traços: Não houve diferença em relação aos grupos SHAM e CLP.

7 CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou que a indução da sepse por CLP conseguiu induzir alterações inflamatórias, oxidativas e cognitivas nos animais, sendo que o tratamento com a doxiciclina em ambas as doses foi eficaz em inibir a MMP-9, reduzir a neuroinflamação, melhorar o perfil redox, aumentar os níveis de BDNF e melhorar a cognição dos animais. Estes resultados analisados em conjunto sugerem que a doxiciclina por meio da sua capacidade de inibir MMPs e das suas ações imunomoduladoras e antioxidantes é um potencial fármaco para o tratamento do comprometimento cognitivo apresentado em indivíduos que sobrevivem à sepse.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, set. 2015.
- AMIN, B. et al. Ceftriaxone, a Beta-Lactam Antibiotic, Modulates Apoptosis Pathways and Oxidative Stress in a Rat Model of Neuropathic Pain. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.
- ANTONIO, R. C. et al. Antioxidant effect of doxycycline decreases MMP activity and blood pressure in SHR. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 386, n. 1–2, 2014.
- ARAUJO, C. M. et al. Morus nigra leaf extract improves glycemic response and redox profile in the liver of diabetic rats. **Food and Function**, v. 6, n. 11, 2015.
- ARGAW, A. T. et al. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 6, p. 1977–1982, 10 fev. 2009.
- ASSINGER, A. et al. Platelets in Sepsis: An Update on Experimental Models and Clinical Data. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 17 jul. 2019.
- BARICHELLO, T. et al. Long-Term Cognitive Outcomes After Sepsis: a Translational Systematic Review. **Molecular Neurobiology**, 2019.
- BARICHELLO, T. et al. The blood-brain barrier dysfunction in sepsis. **Tissue Barriers**, 2021.
- BAZZARI, A. H.; BAZZARI, F. H. BDNF Therapeutic Mechanisms in Neuropsychiatric Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8417, 29 jul. 2022.
- BISSETT, D. et al. Phase III Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitor Prinomastat in Non–Small-Cell Lung Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 4, p. 842–849, 1 fev. 2005.
- BOLDEN, C. T.; OLSON, S. D.; COX, C. S. A decade of blood-brain barrier permeability assays: Revisiting old traumatic brain injury rat data for new insights and experimental design. **Microvascular Research**, v. 145, p. 104453, jan. 2023.
- BRAMHALL, S. R. et al. A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. **British Journal of Cancer**, v. 87, n. 2, p. 161–167, 9 jul. 2002.
- CABRAL-PACHECO, G. A. et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. **International Journal of Molecular**

Sciences, v. 21, n. 24, 2020.

CALSAVARA, A. C. et al. TNFR1 absence protects against memory deficit induced by sepsis possibly through over-expression of hippocampal BDNF. **Metabolic brain disease**, v. 30, n. 3, 2015.

CALSAVARA, A. J. C. et al. Factors Associated with Short and Long Term Cognitive Changes in Patients with Sepsis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018a.

CALSAVARA, A. J. C. et al. Post-sepsis cognitive impairment and associated risk factors: A systematic review. **Australian Critical Care**, v. 31, n. 4, p. 242–253, jul. 2018b.

CANDELARIO-JALIL, E.; YANG, Y.; ROSENBERG, G. A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. **Neuroscience**, 2009.

CHAVES FILHO, A. J. M. et al. Doxycycline reverses cognitive impairment, neuroinflammation and oxidative imbalance induced by D-amphetamine mania model in mice: A promising drug repurposing for bipolar disorder treatment? **European Neuropsychopharmacology**, v. 42, p. 57–74, jan. 2021.

CHEN, R. et al. AGER-Mediated Lipid Peroxidation Drives Caspase-11 Inflammasome Activation in Sepsis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 8 ago. 2019.

CHERINKA, B. et al. Marvin: A Tool Kit for Streamlined Access and Visualization of the SDSS-IV MaNGA Data Set. **The Astronomical Journal**, v. 158, n. 2, 2019.

CHU, Q. S. C. et al. A phase II and pharmacological study of the matrix metalloproteinase inhibitor (MMPI) COL-3 in patients with advanced soft tissue sarcomas. **Investigational New Drugs**, v. 25, n. 4, p. 359–367, 20 ago. 2007.

CLEMENS, D. L. et al. Novel antioxidant properties of doxycycline. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.

COLUCCI-D'AMATO, L.; SPERANZA, L.; VOLPICELLI, F. Neurotrophic factor bdnf, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, 2020.

COMIM, C. M. et al. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. **Intensive Care Medicine**, v. 37, n. 4, p. 711–718, 25 abr. 2011.

CUI, Y. H. et al. Injection of Anti-proBDNF Attenuates Hippocampal-Dependent Learning and Memory Dysfunction in Mice With Sepsis-Associated Encephalopathy. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 2021.

DAL-PIZZOL, F. et al. Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis. **Neurochemical Research**, 2010.

DAL-PIZZOL, F. et al. Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis. **Molecular Neurobiology**, 2013.

DANIELSKI, L. G. et al. Brain Barrier Breakdown as a Cause and Consequence of Neuroinflammation in Sepsis. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 1045–1053, 14 fev. 2018.

DE ALMEIDA, L. G. N. et al. Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 74, n. 3, p. 714–770, 30 jul. 2022.

DE FREITAS CARVALHO, M. M. et al. Effects of açai on oxidative stress, ER stress, and inflammation-related parameters in mice with high fat diet-fed induced NAFLD. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8107, 30 maio 2019.

DE SOUZA, P.; SCHULZ, R.; DA SILVA-SANTOS, J. E. Matrix metalloproteinase inhibitors prevent sepsis-induced refractoriness to vasoconstrictors in the cecal ligation and puncture model in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 765, 2015.

DE SOUZA STORK, S. et al. Diabetes Exacerbates Sepsis-Induced Neuroinflammation and Brain Mitochondrial Dysfunction. **Inflammation**, v. 45, n. 6, p. 2352–2367, 10 dez. 2022.

DEJAGER, L. et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198–208, abr. 2011.

DELANO, M. J.; WARD, P. A. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. **Immunological Reviews**, 2016.

DELLA GIUSTINA, A. et al. Alpha-lipoic acid attenuates acute neuroinflammation and long-term cognitive impairment after polymicrobial sepsis. **Neurochemistry International**, v. 108, p. 436–447, set. 2017.

DELLA GIUSTINA, A. et al. Fish oil-rich lipid emulsion modulates neuroinflammation and prevents long-term cognitive dysfunction after sepsis. **Nutrition**, v. 70, p. 110417, fev. 2020.

DI CAPRIO, R. et al. Anti-Inflammatory Properties of Low and High Doxycycline Doses: An *In Vitro* Study. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–10, 2015.

EBRAHEM, Q. et al. Cross-Talk between Vascular Endothelial Growth Factor and Matrix Metalloproteinases in the Induction of Neovascularization in Vivo. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 1, p. 496–503, jan. 2010.

ERICKSON, M. A.; BANKS, W. A. Neuroimmune axes of the blood-brain barriers and blood-brain interfaces: Bases for physiological regulation, disease states, and pharmacological interventions. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, 2018.

ER, Ayşe *et al.* Effect of doxycycline and meloxicam on cytokines, brain-derived neurotrophic factor, matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and cyclooxygenase-2 in brain. **Iranian Journal Of Basic Medical Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 10, p. 1328-1334, out. 2020. Mashhad University of Medical Sciences.

EVANS, L. *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. **Intensive Care Medicine**, v. 47, n. 11, 2021.

FEITOSA, R. C. *et al.* Five decades of doxycycline: Does nanotechnology improve its properties? **International Journal of Pharmaceutics**, 2022.

FERREIRA, L. *et al.* Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 22 jul. 2015.

FERREIRA MELLO, B. S. *et al.* Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 10, p. 1521–1529, 1 out. 2013.

GAO, Q.; HERNANDES, M. S. Sepsis-Associated Encephalopathy and Blood-Brain Barrier Dysfunction. **Inflammation**, v. 44, n. 6, p. 2143–2150, 21 dez. 2021.

GONG, W.; WEN, H. Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. In: [s.l.: s.n.]. p. 249–255.

GRÉGOIRE, M. *et al.* High-dose ceftriaxone for bacterial meningitis and optimization of administration scheme based on nomogram. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 9, 2019.

GRIFFIN, M. O. *et al.* Tetracyclines: A pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, 2010a.

GRIFFIN, M. O. *et al.* Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 299, n. 3, p. C539–C548, set. 2010b.

GU, M.; MEI, X.-L.; ZHAO, Y.-N. Sepsis and Cerebral Dysfunction: BBB Damage, Neuroinflammation, Oxidative Stress, Apoptosis and Autophagy as Key Mediators and the Potential Therapeutic Approaches. **Neurotoxicity Research**, v. 39, n. 2, p. 489–503, 2 abr. 2021.

HADJIMICHAEL, A. C. *et al.* The anti-neoplastic effect of doxycycline in

osteosarcoma as a metalloproteinase (MMP) inhibitor: a systematic review. **Clinical Sarcoma Research**, v. 10, n. 1, p. 7, 30 dez. 2020.

HADJIMICHAEL, A. C. et al. Doxycycline inhibits the progression of metastases in early-stage osteosarcoma by downregulating the expression of MMPs, VEGF and ezrin at primary sites. **Cancer Treatment and Research Communications**, v. 32, p. 100617, 2022.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 13 dez. 2012.

HEVENER, K. E. et al. Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 2, p. 444–460, 23 fev. 2009.

HOTCHKISS, R. S. et al. Sepsis and septic shock. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 16045, 22 dez. 2016.

HU, Y. et al. VEGF, a Key Factor for Blood Brain Barrier Injury After Cerebral Ischemic Stroke. **Aging and disease**, v. 13, n. 3, p. 647, 2022.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, fev. 1996.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. Sepse: um problema de saúde pública. Brasília: Conselho Federal de Medicina, 2015. 90 p. Disponível em: <https://www.ilas.org.br/assets/arquivos/ferramentas/livro-sepse-um-problema-desaude-publica-cfm-ilas.pdf>. Acesso em: 16 maio 2022

IWASHYNA, T. J. et al. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. **JAMA**, v. 304, n. 16, 2010.

JARCZAK, D.; NIERHAUS, A. Cytokine Storm—Definition, Causes, and Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11740, 3 out. 2022.

JENSEN, I. J. et al. NK Cell–Derived IL-10 Supports Host Survival during Sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 206, n. 6, 2021.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1.1 Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.

KADRY, H.; NOORANI, B.; CUCULLO, L. A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. **Fluids and Barriers of the CNS**, 2020.

KANG, R. et al. Lipid Peroxidation Drives Gasdermin D-Mediated Pyroptosis in Lethal Polymicrobial Sepsis. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 1, 2018.

KOWIAŃSKI, P. et al. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2018.

KRAEUTER, A. K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.]. v. 1916.

LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, n. 12, 2013.

LEMKUL, J. From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0]. **Living Journal of Computational Molecular Science**, v. 1, n. 1, 2019.

LI, Y. et al. Protection against acute cerebral ischemia/reperfusion injury by Leonuri Herba Total Alkali via modulation of BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 133, 2021.

LI, Y.; JI, M.; YANG, J. Current Understanding of Long-Term Cognitive Impairment After Sepsis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 6 maio 2022.

LINDORFF-LARSEN, K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, n. 8, p. 1950–1958, jun. 2010.

LOBO, S. M. et al. Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: The Brazilian ICUs project. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, 2019.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, 1951.

MACCHIAGODENA, M. et al. Upgrading and Validation of the AMBER Force Field for Histidine and Cysteine Zinc(II)-Binding Residues in Sites with Four Protein Ligands. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 9, p. 3803–3816, 23 set. 2019.

MACCHIAGODENA, M. et al. Upgraded AMBER Force Field for Zinc-Binding Residues and Ligands for Predicting Structural Properties and Binding Affinities in Zinc-Proteins. **ACS Omega**, v. 5, n. 25, p. 15301–15310, 30 jun. 2020.

MACHADO, F. R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): An observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, 2017.

MACIEL, M. et al. Predicting Long-term Cognitive Dysfunction in Survivors of Critical Illness with Plasma Inflammatory Markers: a Retrospective Cohort Study. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 1, p. 763–767, 7 jan. 2019.

MANABE, T.; HENEKA, M. T. Cerebral dysfunctions caused by sepsis during

ageing. **Nature Reviews Immunology**, 2022.

MANAENKO, A. et al. Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood–brain barrier in a mice hemorrhage model. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, n. 2, p. 206–210, fev. 2011.

MANTZARLIS, K.; TSOLAKI, V.; ZAKYNTHINOS, E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017.

MARGOTTI, W. et al. Oxidative stress in multiple organs after sepsis in elderly rats. **Experimental Gerontology**, v. 160, p. 111705, abr. 2022.

MARKULIN, I. et al. Challenges of repurposing tetracyclines for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, 2022.

MICHELS, M. et al. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 43, p. 54–59, jan. 2015.

MICHELS, M. et al. Microglial Cells Depletion Increases Inflammation and Modifies Microglial Phenotypes in an Animal Model of Severe Sepsis. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 11, p. 7296–7304, 24 nov. 2019.

MIRANDA, P. H. DE A. et al. Oral formulation of DPP-4 inhibitor plus Quercetin improves metabolic homeostasis in type 1 diabetic rats. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

MURI, L. et al. Combining Ceftriaxone with Doxycycline and Daptomycin Reduces Mortality, Neuroinflammation, Brain Damage, and Hearing Loss in Infant Rat Pneumococcal Meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 7, jul. 2019.

NOSRATI, R. et al. The effects of zinc treatment on matrix metalloproteinases: A systematic review. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 56, p. 107–115, dez. 2019.

NOVOCHADLO, M. et al. Folic acid alleviates the blood brain barrier permeability and oxidative stress and prevents cognitive decline in sepsis-surviving rats. **Microvascular Research**, v. 137, p. 104193, 1 set. 2021.

NUKARINEN, E. et al. Targeting matrix metalloproteinases with intravenous doxycycline in severe sepsis - A randomised placebo-controlled pilot trial. **Pharmacological Research**, v. 99, 2015.

NUTI, E. et al. Development of Thioaryl-Based Matrix Metalloproteinase-12 Inhibitors with Alternative Zinc-Binding Groups: Synthesis, Potentiometric, NMR, and Crystallographic Studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 10, p. 4421–4435, 24 maio 2018.

NWAFOR, D. C. et al. Targeting the Blood-Brain Barrier to Prevent Sepsis-Associated Cognitive Impairment. **Journal of Central Nervous System Disease**, v. 11, p. 117957351984065, 9 jan. 2019.

OLEJARZ, W.; ŁACHETA, D.; KUBIAK-TOMASZEWSKA, G. Matrix Metalloproteinases as Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 3946, 31 maio 2020.

PALDINO, E. et al. Neuroprotective Effects of Doxycycline in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 4, 2020.

PAN, S. et al. Sepsis-Induced Brain Dysfunction: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1–13, 24 ago. 2022.

PAN, Y. et al. Consideration of Molecular Weight during Compound Selection in Virtual Target-Based Database Screening. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n. 1, p. 267–272, 1 jan. 2003.

PARKHURST, C. N. et al. Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. **Cell**, v. 155, n. 7, p. 1596–1609, dez. 2013.

PARSONS, S. L.; WATSON, S. A.; STEELE, R. J. C. Phase I/II trial of batimastat, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with malignant ascites. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 23, n. 6, p. 526–531, dez. 1997.

PATEL, A. et al. Immunomodulatory Effect of Doxycycline Ameliorates Systemic and Pulmonary Inflammation in a Murine Polymicrobial Sepsis Model. **Inflammation**, v. 43, n. 3, 2020.

PU, Y. et al. The protective effects of Mirtazapine against lipopolysaccharide (LPS)-induced brain vascular hyperpermeability. **Bioengineered**, v. 13, n. 2, 2022.

QIU, L.-L. et al. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in the hippocampus might contribute to microglial activation in postoperative cognitive dysfunction in aged mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 51, p. 109–118, jan. 2016.

QIU, L. L. et al. Dysregulation of BDNF/TrkB signaling mediated by NMDAR/Ca²⁺/calpain might contribute to postoperative cognitive dysfunction in aging mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, 2020.

RAHMANI, M.; NEGRO ÁLVAREZ, S. E.; HERNÁNDEZ, E. B. The potential use of tetracyclines in neurodegenerative diseases and the role of nano-based drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.

175, p. 106237, ago. 2022.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 3, 2008.

REINHART, K. et al. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 5, 2017.

REIS, P. A.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C. Systemic Response to Infection Induces Long-Term Cognitive Decline: Neuroinflammation and Oxidative Stress as Therapeutical Targets. **Frontiers in Neuroscience**, 2022.

REMPE, R. G.; HARTZ, A. M. S.; BAUER, B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 2016.

REN, Z.; CHEN, J.; KHALIL, R. A. Zymography as a research tool in the study of matrix metalloproteinase inhibitors. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.]. v. 1626.

RICCI, S. et al. Combined therapy with ceftriaxone and doxycycline does not improve the outcome of meningococcal meningitis in mice compared to ceftriaxone monotherapy. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 505, 13 dez. 2020.

ROBINSON, B. D. et al. Doxycycline prevents blood–brain barrier dysfunction and microvascular hyperpermeability after traumatic brain injury. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 5415, 30 mar. 2022.

ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. **The Lancet Neurology**, 2009.

RUDD, K. E. et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, 2020.

RUIZ, S. et al. Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 4, n. 1, p. 22, 18 dez. 2016.

SANTOS, L. H. S.; FERREIRA, R. S.; CAFFARENA, E. R. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. In: [s.l.: s.n.]. p. 13–34.

SANZ CODINA, M.; ZEITLINGER, M. Biomarkers Predicting Tissue Pharmacokinetics of Antimicrobials in Sepsis: A Review. **Clinical Pharmacokinetics**, 2022.

SAUER, A.; PUTENSEN, C.; BODE, C. Immunomodulation by Tetracyclines in the Critically Ill: An Emerging Treatment Option? **Critical Care**, v. 26, n. 1, p. 74, 22 dez. 2022.

- SAVI, F. F. et al. What animal models can tell us about long-term cognitive dysfunction following sepsis: A systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 124, p. 386–404, maio 2021.
- SCHEURER, M. et al. PyContact: Rapid, Customizable, and Visual Analysis of Noncovalent Interactions in MD Simulations. **Biophysical Journal**, v. 114, n. 3, p. 577–583, fev. 2018.
- SEKINO, N.; SELIM, M.; SHEHADAH, A. Sepsis-associated brain injury: underlying mechanisms and potential therapeutic strategies for acute and long-term cognitive impairments. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 101, 29 dez. 2022.
- SHAN, Y. et al. The glucagon-like peptide-1 receptor agonist reduces inflammation and blood-brain barrier breakdown in an astrocyte-dependent manner in experimental stroke. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 242, 28 dez. 2019.
- SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801, 23 fev. 2016.
- SINGH, S.; KHANNA, D.; KALRA, S. Minocycline and Doxycycline: More Than Antibiotics. **Current Molecular Pharmacology**, v. 14, n. 6, 2021.
- SJAASTAD, F. V. et al. Inducing Experimental Polymicrobial Sepsis by Cecal Ligation and Puncture. **Current Protocols in Immunology**, v. 131, n. 1, 2020.
- SOGAYAR, A. M. C. et al. A Multicentre, Prospective Study to Evaluate Costs of Septic Patients in Brazilian Intensive Care Units. **PharmacoEconomics**, v. 26, n. 5, p. 425–434, 2008.
- SORSA, T. et al. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. **Annals of Medicine**, v. 38, n. 5, p. 306–321, 8 jan. 2006.
- SOUSA DA SILVA, A. W.; VRANKEN, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 367, 23 dez. 2012.
- SUN, C.; ARMSTRONG, M. J. Treatment of Parkinson's Disease with Cognitive Impairment: Current Approaches and Future Directions. **Behavioral Sciences**, v. 11, n. 4, p. 54, 17 abr. 2021.
- SWEENEY, M. D.; SAGARE, A. P.; ZLOKOVIC, B. V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neurology**, 2018.
- TAI, C.-H. et al. A new avenue for treating neuronal diseases: Ceftriaxone, an old antibiotic demonstrating behavioral neuronal effects. **Behavioural Brain Research**, v. 364, p. 149–156, maio 2019.

TANG, A. et al. Prognostic role of elevated VEGF in sepsis: A systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Physiology**, v. 13, 22 jul. 2022.

TOMASI, C. D. et al. Biomarkers of Delirium in a Low-Risk Community-Acquired Pneumonia-Induced Sepsis. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 1, p. 722–726, 14 jan. 2017.

VAN DEN BERG, M. et al. Hospital-related costs of sepsis around the world: A systematic review exploring the economic burden of sepsis. **Journal of Critical Care**, v. 71, p. 154096, out. 2022.

VAN DER POLL, T. et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Reviews Immunology**, 2017.

VAN DER POLL, T.; SHANKAR-HARI, M.; WIERSINGA, W. J. The immunology of sepsis. **Immunity**, v. 54, n. 11, p. 2450–2464, nov. 2021.

WANG, H. E. et al. Trajectory of Cognitive Decline After Sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 49, n. 7, 2021a.

WANG, J. et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157–1174, 15 jul. 2004.

WANG, J. et al. Inhibition of ferroptosis protects sepsis-associated encephalopathy. **Cytokine**, v. 161, p. 156078, jan. 2023.

WANG, L. et al. Suppressing STAT3 activity protects the endothelial barrier from VEGF-mediated vascular permeability. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 14, n. 11, 2021b.

WANG, P. et al. Prolonged Soluble Epoxide Hydrolase Reactivity in Brain Endothelial Cells Is Associated with Long Cognitive Deficits in Sepsis. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 6, p. 2846–2855, 6 jun. 2020.

WEN, Q. et al. Cortistatin-14 Exerts Neuroprotective Effect Against Microglial Activation, Blood-brain Barrier Disruption, and Cognitive Impairment in Sepsis-associated Encephalopathy. **Journal of Immunology Research**, v. 2022, p. 1–10, 13 set. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global report on the epidemiology and burden of sepsis: current evidence, identifying gaps and future directions. 2020.

YAN, X. et al. Central role of microglia in sepsis-associated encephalopathy: From mechanism to therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 26 jul. 2022.

YANG, C.-H. et al. Simvastatin attenuates sepsis-induced blood-brain barrier integrity loss. **Journal of Surgical Research**, v. 194, n. 2, p. 591–598, abr. 2015.

YANG, C. et al. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 316, n. 2, 2019.

YANG, G. et al. Minocycline Pretreatment Prevents Blood–Brain Barrier Disruption in Septic Rats. **Journal of Surgical Research**, v. 273, 2022.

YAO, L. et al. Evans Blue Dye: A Revisit of Its Applications in Biomedicine. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 2018, p. 1–10, 2018.

YU, Y. et al. Hydrogen gas alleviates blood-brain barrier impairment and cognitive dysfunction of septic mice in an Nrf2-dependent pathway. **International Immunopharmacology**, v. 85, p. 106585, ago. 2020.

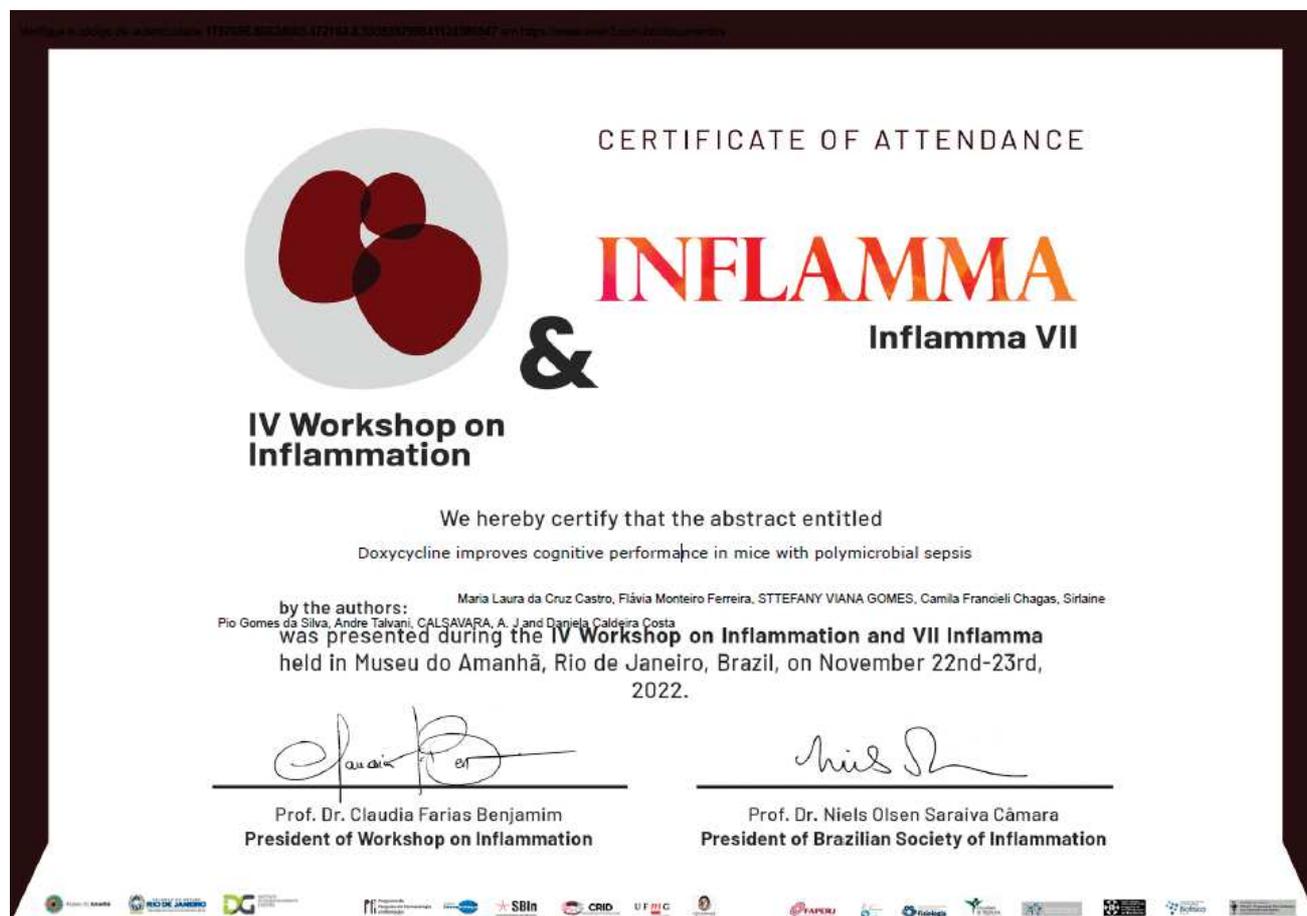
ZARBATO, G. F. et al. Dimethyl Fumarate Limits Neuroinflammation and Oxidative Stress and Improves Cognitive Impairment After Polymicrobial Sepsis. **Neurotoxicity Research**, v. 34, n. 3, p. 418–430, 30 out. 2018.

ZHANG, Y. YU; NING, B. TAO. Signaling pathways and intervention therapies in sepsis. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 2021.

ZHAO, G. J. et al. Prognostic value of plasma tight-junction proteins for sepsis in emergency department: An observational study. **Shock**, v. 45, n. 3, 2016.

ZHAO, Y. et al. The Role of Ferroptosis in Blood–Brain Barrier Injury. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 1 fev. 2022.

ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da doxiciclina na melhora cognitiva de animais com sepse polimicrobiana: papel da metaloproteínase cerebral na regulação das vias neuro inflamatórias e oxidativas.", protocolada sob o CEUA nº 1310110521 (000619), sob a responsabilidade de **Daniela Caldeira Costa Calsavara e equipe; Maria Laura da Cruz Castro; Allan Jefferson Cruz Calsavara; Flávia Monteiro Ferreira; Sttefany Viana Gomes; João Vítor Basílio Barros** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 27/07/2021.

We certify that the proposal "Effect of doxycycline on the cognitive improvement of animals with polymicrobial sepsis: the role of cerebral metalloproteinase in the regulation of neuroinflammatory and oxidative pathways.", utilizing 235 isogenic mice (males and females), protocol number CEUA 1310110521 (000619), under the responsibility of **Daniela Caldeira Costa Calsavara and team; Maria Laura da Cruz Castro; Allan Jefferson Cruz Calsavara; Flávia Monteiro Ferreira; Sttefany Viana Gomes; João Vítor Basílio Barros** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 07/27/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica) e Treinamento

Vigência da Proposta: de 08/2021 a 02/2023

Área: Ciências Biológicas

Origem: Centro de Ciência Animal

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 8 a 12 semanas

N: 235

Linhagem: C57BL/6

Peso: 20 a 30 g

Local do experimento: Os animais ficarão no Centro de Ciência Animal (CCA) na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) ao longo do período de experimentação que compreende o procedimento cirúrgico e tratamento. Para a realização dos ensaios cognitivos, os animais serão retirados do CCA e transferidos para o Laboratório de Cognição e Saúde localizado na Escola de Medicina. Os animais ficarão no Laboratório de Cognição e Saúde apenas para a realização dos ensaios cognitivos que não excederá o tempo de 6 horas, o manipulador estará presente durante todo o tempo do experimento e ao término os animais retornarão para a área de quarentena do CCA até o momento da eutanásia (referente a 1 dia). Para o procedimento da eutanásia, os animais serão encaminhados para o Laboratório de Bioquímica Metabólica localizado no Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da UFOP.

Ouro Preto, 28 de julho de 2022



Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto



Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

