



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**KLISTENES ALVES DE LIMA**

**ESTUDO DOS SINTOMAS DO TIPO DELIRIUM CAUSADOS POR  
LEVOFLOXACINA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO  
INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

**FORTALEZA**

**2024**

KLISTENES ALVES DE LIMA

**ESTUDO DOS SINTOMAS DO TIPO DELIRIUM CAUSADOS POR  
LEVOFLOXACINA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO  
INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Neuropsicofarmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- L698e Lima, Klístenes Alves de.  
Estudo dos sintomas do tipo delírium causados por levofloxacina em camundongos submetidos ao modelo inflamatório induzido por lipopolissacarídeo / Klístenes Alves de Lima. – 2024.  
103 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2024.  
Orientação: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles.
1. Delírium. 2. Levofloxacina. 3. Lipopolissacarídeo. 4. Neuroinflamação. 5. Citocinas. I. Título.  
CDD 615.1
-

KLISTENES ALVES DE LIMA

**ESTUDO DOS SINTOMAS DO TIPO DELIRIUM CAUSADOS POR  
LEVOFLOXACINA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO  
INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.  
Área de concentração:  
Neuropsicofarmacologia.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Jamile Magalhães Ferreira  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

---

Dra. Alana Gomes de Souza  
Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HU-UFG)

A Deus.

Aos meus pais, Maria Nivanda e Francisco (*in  
memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser essencial em minha vida, me conceder sabedoria, socorro nas horas de angústia, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

À minha mãe, Maria Nivanda, por todo sacrifício, por se dedicar e abdicar de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar. Obrigado por me proporcionar, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e de procurar sempre em Deus a força maior para o meu desenvolvimento como ser humano. Obrigado por tudo, meu amor!

Ao meu pai (*in memoriam*) por todo o carinho, ensinamento e por guiar os meus passos.

À minha irmã, Kathiuscia, que sempre me incentivou, torceu e me ajudou na realização desse sonho. Sem ela teria sido impossível chegar até aqui. Agradeço todo o carinho, a dedicação e a ajuda na formatação deste trabalho.

Ao meu irmão, Kildary, pelo apoio ao longo dessa jornada.

Aos colegas do Laboratório de Neuropsicofarmacologia por toda ajuda e dicas valiosas. Em especial ao Adriano Chaves, que foi fundamental para a execução desse estudo.

À Alana Gomes, por me apoiar sempre, mesmo distante consegue se fazer presente em todas as situações. O seu apoio foi fundamental nessa conquista. Amo você!

À Iardja Stefanny, pela ajuda nos experimentos e nas análises estatísticas dos resultados.

Ao Raul, bolsista de iniciação científica, por toda ajuda ao longo desse estudo. Muitas vezes foi meus braços, minhas pernas e minha cabeça. Muitíssimo obrigado, amigo!

Ao Júnior, técnico do NEMPI, pelo apoio nas imunohistoquímicas.

À Josy, aluna de Pós-Doutorado, pela paciência e pelo tempo dedicado em auxiliar nas fotografias de imunohistoquímica. E pelo apoio psicológico nessa reta final.

Ao Pedro Everson por todo apoio ao longo dessa caminhada.

Ao Arnaldo, técnico do laboratório, pela ajuda na dosagem de aminoácidos e monoaminas. E por ser solícito sempre que precisei do seu apoio.

À Professora Antoniella, por toda presteza e dedicação nas análises das lâminas de HE. Não tenho palavras para agradecê-la. Muito obrigado!

Aos veterinários e funcionários do Biotério, Gabi, Wesley, Augusto e Sr. Adauto, pela presteza e cuidado dedicado aos animais.

À Milena e à Laura, secretárias do programa, por toda dedicação e empatia ao

próximo. Vocês são excelentes profissionais e seres humanos.

Aos professores pela dedicação, pelo empenho, pelo profissionalismo e por todo conhecimento repassado, que contribuíram nesse processo de formação profissional.

À Professora Dra. Marta Fonteles, minha orientadora, pessoa que tenho um imenso carinho e admiração. Minha eterna gratidão, muito obrigado pela paciência ao longo desses anos.

Aos membros da banca pela disposição em contribuir com este trabalho.

Ao CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado!

“Quando penso que cheguei ao meu limite,  
descubro que tenho forças para ir além”.  
(Ayrton Senna da Silva).

## RESUMO

O *delirium* é uma síndrome clínica de disfunção cerebral aguda, caracterizada por um estado confusional com declínio da cognição que flutua ao longo de horas ou dias. É associado a desfechos ruins, incluindo o aumento de internações hospitalares e altas taxas de morbidade e mortalidade. Está correlacionado a diversos fatores ambientais, medicamentosos ou patológicos. No entanto, a literatura sobre *delirium* ou psicose associado ao uso de fluoroquinolonas é limitada a relatos de casos e o mecanismo preciso por trás dessa associação é desconhecido. Diante do exposto, torna-se relevante propor um possível mecanismo para essa disfunção cerebral que pode ser induzida por essa classe de antibióticos. Para tanto, camundongos Swiss machos (22 - 28g) sadios foram tratados com levofloxacina (100mg/kg e 150mg/kg de 24/24horas), ou escopolamina (1,5mg/kg), ou veículo por via intraperitoneal durante 10 dias. No 9º dia de tratamento, alguns grupos experimentais receberam lipopolissacarídeo (LPS) 0,5mg/kg via intraperitoneal para ativar a resposta imune. Os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliar a atividade locomotora (Campo Aberto), comportamento depressivo-símile (Nado forçado), performance cognitiva (Labirinto em Y) e coordenação motora (Rota-Rod). Após a avaliação comportamental, as áreas cerebrais cortex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo foram dissecadas para a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo (MDA, nitrito e GSH) e dosagens de neurotransmissores (DOPA, DOPAC, GABA e Glutamato). Além disso, foram dosadas citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) no soro. e foram analisados do seguintes parâmetros no hipocampo: viabilidade celular; alterações histopatológicas; expressão de marcadores de reatividade astrocitária e ativação glial (GFAP e Iba-1, respectivamente) por imunohistoquímica. O tratamento com LPS induziu comportamentos ansiogênico e depressivo-símiles, déficit cognitivo e de coordenação motora, níveis elevados de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , aumentou parâmetros de estresse oxidativo (MDA e nitrito), diminuiu GSH, alterou níveis de neurotransmissores específicos, promoveu um aumento das áreas marcadas por GFAP e Iba-1, além de provocar alterações histopatológicas. A escopolamina induziu déficit cognitivo e alteração na coordenação motora, aumentou os níveis de MDA e de nitrito, mas reduziu GSH nas áreas estudadas, diminuiu os níveis de dopamina e GABA, mas aumentou glutamato e foi capaz de provocar alterações histopatológicas e aumentar áreas marcadas por GFAP e Iba-1. A levofloxacina na dose de 100mg/kg não alterou parâmetros comportamentais, aumentou níveis de MDA em córtex pré-frontal e hipocampo, mas não alterou de forma significativa a expressão de interleucinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), nem a expressão de neurotransmissores específicos. No entanto, a levofloxacina na dose de 150mg/kg foi capaz de induzir déficit cognitivo e de coordenação motora, assim como comportamento depressivo-símile; aumentou os níveis de MDA e nitrito-nitrito, mas reduziu GSH; alterou significativamente a expressão de TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$ ; aumentou os níveis de glutamato e diminuiu GABA. Ambas as doses estudadas promoveram um aumento das áreas marcadas por GFAP e Iba-1, além de provocar alterações histopatológicas.

**Palavras-chave:** Delirium; Levofloxacina; Lipopolissacarídeo; Neuroinflamação; Citocinas.

## ABSTRACT

### STUDY OF DELIRIUM-TYPE SYMPTOMS CAUSED BY LEVOFLOXACIN IN MICE SUBJECTED TO THE INFLAMMATORY MODEL INDUCED BY LIPOPOLYSACCHARIDE

Delirium is a clinical syndrome of acute brain dysfunction characterized by a state of confusion with decline in cognition that fluctuates over hours or days. It is associated with devastating stages, including increased hospital admissions and high rates of morbidity and mortality. It is correlated to several environmental, medicinal or pathological factors. However, the literature on delirium or psychosis associated with fluoroquinolone use is limited to case reports and the precise mechanism behind this association is unknown. Given the above, it is relevant to propose a possible mechanism for this brain dysfunction that may be caused by this class of antibiotics. To this end, healthy male Swiss mice (22 - 28g) were treated with levofloxacin (100mg/kg and 150mg/kg every 24 hours), or scopolamine (1.5mg/kg), or vehicle intraperitoneally for 10 days. On the 9th day of treatment, some experimental groups received lipopolysaccharide (LPS) 0.5mg/kg intraperitoneally to activate the immune response. The animals were subjected to behavioral tests evaluating locomotor activity (Open Field), depressive-like behavior (Requested Swimming), cognitive performance (Y-Maze) and motor development (Rota-Rod). After the behavioral assessment, the cognitive areas (prefrontal cortex, striatum and hippocampus) were dissected to evaluate oxidative stress parameters (MDA, nitrite and GSH) and neurotransmitter levels (DOPA, DOPAC, GABA and Glutamate). Cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) were measured in serum. The hippocampi were found for analysis of the following parameters: cellular targets; histopathological changes; expression of markers of astrocytic reactivity and glial activation (GFAP and Iba-1, respectively) by immunohistochemistry. Treatment with LPS induced anxiogenic and depressive-like behaviors, cognitive and motor coordination deficits, elevated levels of cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , increased oxidative stress parameters (MDA and nitrite), decreased GSH and altered levels of specific neurotransmitters promoted an increase in areas marked by GFAP and Iba-1. In addition to causing histopathological changes such as: presence of a pyknotic nucleus, retraction of the neuronal body, vascular congestion, vacuolization and edema. Scopolamine induced cognitive deficit and changes in motor coordination, increased MDA and nitrite levels, but reduced GSH in the areas studied, decreased dopamine and GABA levels, but increased glutamate. It was able to cause histopathological changes and increase areas marked by GFAP and Iba-1. Levofloxacin at a dose of 100mg/kg did not change behavioral parameters, increased MDA levels in the prefrontal cortex and hippocampus, but did not significantly alter the expression of pro-inflammatory interleukins (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) nor the expression of specific neurotransmitters. However, levofloxacin at a dose of 150 mg/kg was capable of inducing cognitive and motor coordination deficits, as well as depressive-like behavior; increased MDA and nitrate-nitrite levels, but reduced GSH; significantly altered the expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ; increased glutamate levels and decreased GABA. Both doses studied promoted an increase in areas marked by GFAP and Iba-1, in addition to causing histopathological changes.

**Keywords:** Delirium; Levofloxacin; Lipopolysaccharide; Neuroinflammation; Cytokines.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Domínios clássicos do <i>delirium</i> .....	19
Figura 2 - Critérios diagnósticos do <i>delirium</i> segundo o DSM-V.....	20
Figura 3 - Tipos de delirium e os seus desfechos clínicos.....	23
Figura 4 - Estrutura química geral das fluoroquinolonas .....	27
Figura 5 - Efeito da super helicidade na conformação de um pequeno círculo de DNA .....	28
Figura 6 - Procedimento Experimental.....	38
Figura 7 - Teste do Campo Aberto.....	39
Figura 8 - Teste do Nado Forçado .....	40
Figura 9 - Teste do Labirinto em Y.....	41
Figura 10 - Teste do Rota-Rod.....	41
Figura 11 - Efeito da administração de levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina sobre a atividade locomotora e comportamentos ansiedade-símile no teste do campo aberto em camundongos .....	48
Figura 12 - Efeito da administração de levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos .....	49
Figura 13 - Efeito da administração de levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina sobre as alternâncias corretas no labirinto em Y em camundongos .....	50
Figura 14 - Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de nitrato/nitrito no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos .....	53
Figura 15 - Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de MDA no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos.....	55
Figura 16 - Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de GSH em camundongos.....	57
Figura 17 - Efeito da administração de ESC e LEV sobre a concentração de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ em hipocampo de camundongos .....	58
Figura 18 - Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de DOPA e DOPAC em hipocampo de camundongos. ....	60
Figura 19 - Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de glutamato em camundongos. ....	61
Figura 20 - Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de GABA em camundongos.....	63
Figura 21 – Fotomicrografias do córtex pré-frontal de camundongos tratados com	

levofloxacin. Magnification of 200x, staining: hematoxylin and eosin. (A) Control group, (B) LPS group, (C) ESC group, (D) LEV 100 mg/Kg group, (E) LEV 150 mg/Kg group, (F) ESC + LPS group, (G) LEV 100 mg/Kg + LPS group, (H) LEV 150 mg/Kg + LPS group.....65

Figura 22 – Photomicrographs of the striatum of mice treated with levofloxacin. Magnification of 200x, staining: hematoxylin and eosin. (A) Control group, (B) LPS group, (C) ESC group, (D) LEV 100 mg/Kg group, (E) LEV 150 mg/Kg group, (F) ESC + LPS group, (G) LEV 100 mg/Kg + LPS group, (H) LEV 150 mg/Kg + LPS group.....67

Figura 23 – Photomicrographs of the hippocampus of mice treated with levofloxacin. Magnification of 200x, staining: hematoxylin and eosin. (A) Control group, (B) LPS group, (C) ESC group, (D) LEV 100 mg/Kg group, (E) LEV 150 mg/Kg group, (F) ESC + LPS group, (G) LEV 100 mg/Kg + LPS group, (H) LEV 150 mg/Kg + LPS group.....69

Figura 24 – Effect of ESC and LEV administration on GFAP expression in the dentate gyrus of the hippocampus.....71

Figura 25 – Effect of ESC and LEV administration on GFAP expression in CA1 in the hippocampus.....73

Figura 26 – Effect of ESC and LEV administration on GFAP expression in CA3 in the hippocampus.....74

Figura 27 – Effect of ESC and LEV administration on IBA1 expression in CA1 in the hippocampus.....76

Figura 28 – Effect of ESC and LEV administration on IBA1 expression in CA3 in the hippocampus.....78

Figura 29 – Effect of ESC and LEV administration on IBA1 expression in the dentate gyrus of the hippocampus.....79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Drogas utilizadas.....	36
Tabela 2 – Grupos Experimentais.....	38
Tabela 3 – Score de alterações histopatológica em córtex pré-frontal de camundongos.....	66
Tabela 4 – Score de alterações histopatológica em corpo estriado de camundongos.....	68
Tabela 5 – Score de alterações histopatológica em hipocampo de camundongos.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
ApoE	Apolipoproteína E
BHE	Barreira Hematoencefálica
CAM	Confusion Assessment Method
CAM-ICU	Method for the intensive care unit
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAMPS	Damage-associated Molecular Patterns
D1R	Receptores de Dopamina D1
D4R	Receptores de Dopamina D4
DNA	Desoxiribo Nucleic Acid
DOPA	Di-hidroxi-fenilalanina
DOPAC	Ácido 3,4-diidroxifenilacético
DSM-V	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GSH	Glutathione Redutase
HCL	Ácido Clorídrico
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
ICDSC	Intensive care Delirium Scruning Checklist
IL-1	Interleucina-1
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
L-Dopa	Dihidroxifenilalanina
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malonildialdeído
MHC	Major Histocompatibility Complex
NEED	N-(1-naftil)etilenodiamina
NLR	Nod-like

NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
PAMPS	Pathogen Associated Molecular Patterns
PRRs	Pattern Recognition Receptors
REM	Rapid Eye Movement
SAA	Serum Acetylcholinesterase Activity
SIFH	System Integration Failure Hypothesis
SNC	Sistema Nervoso Central
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TLR	Toll-like
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
XAMPS	Xenobiotic-associated Molecular Patterns

## LISTA DE SÍMBOLOS

pH	Potencial Hidrogeniônico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
Km	Quilômetro
cm	Centímetro
Kg	Quilograma
g	Gramma
mg	Miligrama
mm	Milímetro
pg/g	Picograma por Grama
mM	Milimolar
μL	Microlitro
K	Kapa
β	Beta
α	Alfa
ε	Epsilon
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Delirium: conceito, epidemiologia e classificação .....	18
1.2 Fisiopatologia do Delirium .....	21
1.3 Modelos animais de delirium .....	24
1.4 Quinolonas: histórico, estrutura química e efeitos colaterais .....	26
1.5 Aspectos imunológicos do delirium, neuroinflamação e estresse oxidativo.....	29
1.6 Marcadores biológicos do delirium: Neurotransmissores e proteínas importantes.....	31
2 JUSTIFICATIVA .....	33
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
4.1 Animais .....	36
4.2 Drogas .....	36
4.3 Delineamento Experimental .....	38
4.4 Testes Comportamentais.....	39
4.4.1 Campo Aberto.....	39
4.4.2 Nado Forçado.....	39
4.4.3 Labirinto em Y.....	40
4.4.4 Rota-Rod.....	41
4.5 Testes Neuroquímicos .....	42
4.5.1 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo .....	42
4.5.1.1 Determinação dos níveis de nitrato/nitrito.....	42
4.5.1.2 Avaliação da peroxidação lipídica .....	42
4.5.1.3 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH).....	42
4.5.2 Determinação de monoaminas e aminoácidos.....	43
4.5.3 Determinação dos níveis de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ .....	43
4.6 Análise Histopatológica .....	44
4.7 Imunohistoquímica para GFAP e Iba-1.....	45
4.8 Análise Estatística .....	45
5 RESULTADOS.....	47
5.1 Avaliação comportamental.....	47

5.1.1 Efeito da administração da levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina sobre a atividade locomotora e comportamentos ansiedade-símile no teste do campo aberto em camundongos.....	47
5.1.2 Efeito da administração de levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.....	49
5.1.3 Efeito da administração de levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina sobre as alternâncias corretas no labirinto em Y em camundongos.....	50
5.1.4 Efeito da administração de levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina em camundongos sobre o número de quedas em barra giratória.....	51
5.2 Avaliação Neuroquímica.....	52
5.2.1 Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de nitrato/nitrito em camundongos.....	52
5.2.2 Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de MDA em camundongos.....	54
5.2.3 Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de GSH em camundongos.....	56
5.2.4 Efeito da administração de ESC e LEV sobre a concentração de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ em soro de camundongos.....	58
5.2.5 Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de DOPA e DOPAC em hipocampo de camundongos.....	59
5.2.6 Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de glutamato em camundongos.....	60
5.2.7 Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de GABA em camundongos.....	62
5.3 Avaliação Histopatológica.....	64
5.3.1 Efeito da administração de ESC e LEV sobre as alterações histopatológicas no córtex pré-frontal de camundongos.....	64
5.3.2 Efeito da administração de ESC e LEV sobre as alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos.....	66
5.3.3 Efeito da administração de ESC e LEV sobre as alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos.....	68
5.4 Avaliação Imunohistoquímica.....	70
5.4.1 Efeitos da submissão à ESC e à LEV na imunomarcção para expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em diferentes áreas do hipocampo.....	70

<i>5.4.2 Efeitos da submissão à ESC e à LEV na imunomarcção para expressão da molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1 (IBA-1) em diferentes áreas do hipocampo .....</i>	<i>75</i>
<i>6 DISCUSSÃO .....</i>	<i>81</i>
<i>7 CONCLUSÃO .....</i>	<i>91</i>
<i>REFERÊNCIAS .....</i>	<i>92</i>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Delirium*: conceito, epidemiologia e classificação

*Delirium*, termo advindo do latim “*delirare*”, que significa estar louco ou ficar enlouquecido, longe da realidade, é uma síndrome neuropsiquiátrica severa tipicamente reversível caracterizada como um fenômeno em 5 domínios: déficit cognitivo, distúrbio psicomotor, déficit de atenção, ritmo circadiano desregulado e desregulação emocional (IGLSELDER *et al.*, 2022; MALDONADO, 2017). Ademais, o quadro pode ser experienciado com sintomas de psicose, tais como delírios e alucinações. Apesar de o termo, historicamente, ser confundido com diversas outras condições, como encefalopatia, disfunção cerebral e síndrome cerebral orgânica, é um quadro clínico comum em pessoas que passam por longos períodos em instituições de cuidados em saúde, já que é um reflexo de um conjunto de fatores tais como idade, comorbidades, número e gravidade dos fatores precipitantes, trazendo um potencial risco aos pacientes em todo o mundo (WILSON, *et al.*, 2020).

A encefalopatia e o *delirium*, ainda que sejam considerados subnotificados, representam 15% dos efeitos adversos de antibióticos para pacientes críticos sob uso de cefalosporinas de quarta geração. Além disso, apesar de uma das possíveis causas reversíveis consideradas serem as medicações, atualmente o *delirium* advindo de antibióticos possui etiologia desconhecida (BHATTACHARYYA, 2016).

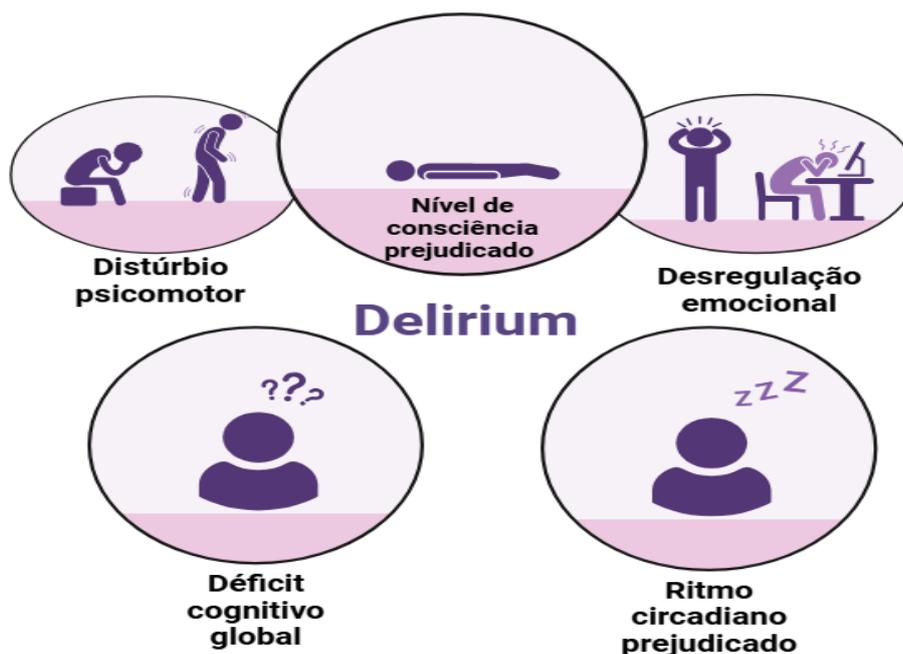
O *delirium* é normalmente acompanhado de demência por conta de a falha cognitiva preexistente ser um dos grandes fatores de risco, sendo assim, essa síndrome é extremamente comum em pessoas idosas e adultos hospitalizados (MATTISON, 2020). Fenotipicamente pode-se dividir o *delirium* em 5 tipos psicomotores, sendo eles classificados classicamente como: hipoativo, hiperativo, misto, e mais recentemente foram descritos o tipo catatônico, marcado por atividade motora de quase coma, e tipo excitado, marcado por uma atividade motora exagerada e alucinações (MALDONADO, 2017).

A condição é identificada em aproximadamente 80% dos pacientes graves em unidade de tratamento intensivo (UTI), e pelo seu potencial de acarretar declínio nas funções motora e cognitiva, essa condição acaba por prolongar a permanência no hospital, aumentar a taxa de readmissão, aumentar os custos hospitalares e a mortalidade dos pacientes (ZHAO, 2024). O manejo e diagnóstico da síndrome se torna difícil pela falta de consenso entre os termos e pelo estado geralmente crítico do portador, o que gera aumentos nos gastos

estimados em até 18.000 dólares ao mês por indivíduo (Al-HOODAR *et al.*, 2021). Apesar do grande impacto negativo em nossa sociedade causado pelo *delirium*, a evolução na clínica e no progresso científico tem sido moderada por impasses fundamentais de recurso e administração, levando à falta de compreensão completa da fisiopatologia desta condição (YANG *et al.*, 2009).

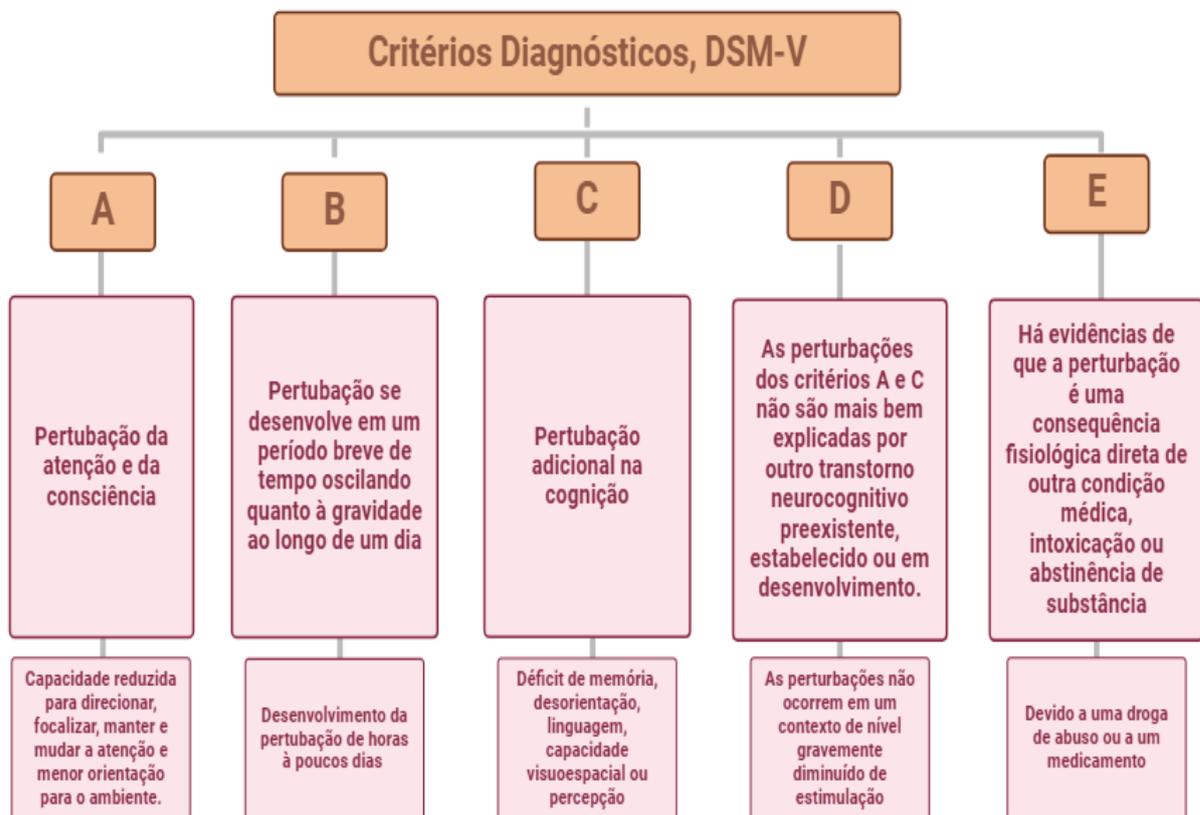
A instalação da síndrome pode se iniciar a partir de vários fatores clínicos e psicopatológicos ditos como precipitantes, como por exemplo idade avançada, neuroinflamação exacerbada, uso de medicações como quinolonas, traumas e outras comorbidades, culminando no desenvolvimento das principais hipóteses dos tempos atuais: hipótese da idade neuronal, hipótese da neuroinflamação, hipótese do estresse oxidativo, hipótese neuroendócrina, hipótese da desregulação circadiana, hipótese dos neurotransmissores, assim como a hipótese da falha de integração do *System Integration Failure Hypothesis* (SIFH). Esta última hipótese propõe que a combinação de uma disfunção neuronal, disfunção motora, disfunção cognitiva e um colapso direto da rede cerebral contribuem para as mudanças de comportamento e cognitivas, reunindo assim, as teorias mais bem aceitas para o desenvolvimento de um paradigma coeso do *delirium* (MALDONADO, 2017).

Figura 1 - Domínios clássicos do delirium



Além das ferramentas de triagem, como a *Intensive Care Delirium Screening Checklist* (ICDSC) e do *Confusion Assessment Method* (CAM), e seu *Method for the Intensive Care Unit* (CAM-ICU), o manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais 5ª edição (DSM-V) é o material mais utilizado na pesquisa e na prática clínica para diagnosticar o *delirium*, caracterizando-o como uma síndrome transitória e sendo explicitadas, entre 5 critérios (A-E), as principais características clínicas fundamentais dessa condição: déficit de atenção, alteração no estado de consciência, gerando distúrbios cognitivos e de humor com início súbito, além das outras alterações neuropsiquiátricas que definem o tipo catatônico e excitado e os três subtipos existentes, sendo eles hipoativo, hiperativo e misto (WILSON, *et al.*, 2020). No entanto, é de suma importância ressaltar que tanto os métodos de triagem como o método descrito pelo DSM-V são pouco sensíveis na prática clínica, conseguindo identificar por volta apenas de 30% dos casos de delirium quando comparado com a identificação realizada por um especialista, sendo que mesmo entre os especialistas a discordância pode ser algo comum (NUMAN *et al.*, 2017).

Figura 2 - Critérios diagnósticos do delirium segundo o DSM-V



Fonte: Elaborada pelo autor.

Portanto, com uma pobre compreensão da fisiopatologia, critérios diagnósticos questionáveis e evidências limitadas para estabelecimento de diretrizes, a prevenção e o manejo do delirium se torna algo verdadeiramente desafiador e a busca por novos conhecimentos etiológicos, uma necessidade.

## 1.2 Fisiopatologia do *Delirium*

A fisiopatologia do *delirium*, apesar de ainda pouco elucidada, envolve a desregulação de diversas vias, tais como: a falta de integridade na neurotransmissão (neurotransmissor não disponível e receptores não funcionais), a neuroinflamação apoptótica acentuada, o estresse oxidativo, o ritmo circadiano prejudicado, o envelhecimento neuronal e os fatores genéticos (INOUYE *et al.*, 2014).

Estudos demonstram que a origem do *delirium* pode estar relacionada à diversos mecanismos patogênicos que culminam no estresse oxidativo e na falha de transmissão colinérgica por conta do excesso de neurotransmissão de dopamina em conjunto com os efeitos adversos advindos de medicações anticolinérgicas e/ou dopaminérgicas (LÔBO *et al.*, 2010). O estresse crônico periférico, por sua vez, pode ser um importante mecanismo para compreendermos a fisiopatologia do *delirium*.

Micróglia, macrófagos residentes do sistema nervoso central (SNC), são responsáveis por interagir nas sinapses neuronais. Essas células podem ser ativadas de forma pró-inflamatória a partir da interação com *Damage-associated Molecular Patterns* (DAMPS) e *Pathogen Associated Checklist Molecular Patterns* (PAMPS), além também da interação com os chamados *Xenobiotic-associated Molecular Patterns* (XAMPS), levando ao aumento de mediadores inflamatórios no cérebro, o que pode estar associado ao déficit cognitivo (JALLEH *et al.*, 2012). As citocinas pró-inflamatórias levam ao aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), o que causa ativação endotelial, fluxo sanguíneo prejudicado e apoptose neuronal. Além disso, o ambiente pró-inflamatório pode levar à ativação simpática e do eixo adrenocortical o que gera uma condição chamada de hipercortisolismo crônico, fator contribuinte para o desenvolvimento do *delirium* (INOUYE *et al.*, 2014).

Em respeito ao ciclo circadiano, a arquitetura do sono varia de cada indivíduo de acordo com suas necessidades fisiológicas, idade, sexo e comorbidades, porém o sono normal para o ser humano é composto de ciclos de *Rapid Eye Movement* (REM) e 3 estágios de sono não REM (NREM) (COOKE *et al.*, 2011). Sendo assim, para o bom funcionamento do

organismo é ideal que os estágios do sono não sejam perturbados. Como o sono nas unidades de tratamento intensivo (UTI) geralmente é prejudicado (PISANI *et al.*, 2015), os pacientes costumam ter o seu ciclo interrompido com despertares frequentes, o que gera alterações nas estruturas e funções de redes neuronais específicas contribuindo para o surgimento do *delirium* a partir de mecanismos como: alterações na transmissão gabaérgica, deficiência e secreção anormal de melatonina e desregulação no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (DAOU *et al.*, 2020).

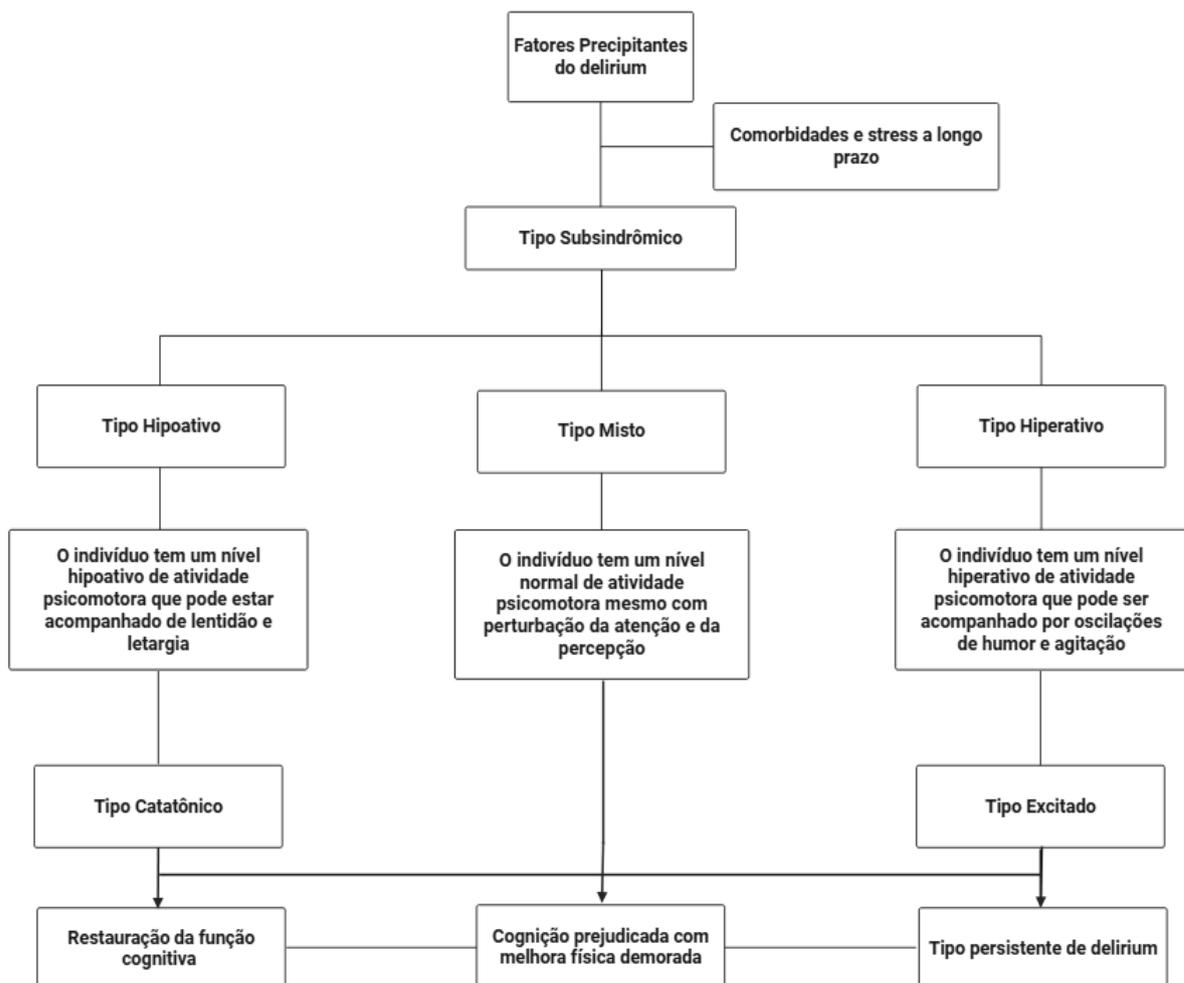
A respeito dos fatores genéticos, estudos inconclusivos demonstraram que eles podem contribuir para o desenvolvimento de um *delirium* mais longo ou mais curto a partir da expressão do alelo *Apolipoprotein E* (APOE)  $\epsilon$ 4 (SEPULVEDA *et al.*, 2021). No entanto, a escassez de estudos com metodologias bem delineadas indica a necessidade de novas pesquisas.

Sendo assim, muitas teorias ao longo dos anos têm sido descritas com o propósito de explicar a etiologia dessa síndrome a partir de processos patológicos e mecanismos específicos. Essas teorias de modo geral ao invés de serem excludentes acabam por complementar umas às outras, e por fim acabam convergindo em uma hipótese que aborda a fisiopatologia do *delirium* de forma mais unitária e coesa, sendo ela a hipótese da falha de integração do sistema (SIFH) (MALDONADO, 2017).

A SIFH destaca as principais áreas de interseções e pontos em comum entre as teorias etiopatogênicas do *delirium* e explica como essas diferentes variáveis levam ao declínio de cognição e de atenção característicos do *delirium* (GARCEZ *et al.*, 2021). De acordo com essa hipótese, um número variável de fatores precipitantes são os responsáveis por desencadear o desenvolvimento do *delirium*. Estes fatores precipitantes possuem diferentes efeitos biológicos em cada indivíduo, devido aos seus substratos neurológicos, como nível de neuroinflamação, estresse oxidativo, idade, entre outros. Logo, quanto mais substratos neurológicos de risco ao *delirium* o paciente tiver, maiores serão as chances de ocorrer a deterioração da organização do SNC. Portanto, o impacto de um fator precipitante, por exemplo o uso de uma medicação como as quinolonas, em um organismo com um substrato neurológico já crônico, leva a uma cascata de eventos neurobiológicos responsáveis por gerar desarranjo metabólico e disfunção da neurotransmissão causando um distúrbio neuropsiquiátrico primário, que seria a origem da fase subsindrômica do *delirium* (MALDONADO, 2017). Como uma sequência de eventos em cascata, as alterações na neurotransmissão de dopamina e acetilcolina afetam diretamente as vias gabaérgicas e glutamatérgicas assim como importantes áreas cerebrais incluindo a substância negra/área

tegmentar ventral, o tálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e o *striatum*. Nesse contexto, quando o organismo se encontra sob uma atividade ou transmissão colinérgica normal na região pré-frontal, a acetilcolina facilita a ativação do sistema atencional anterior, ou sistema de execuções, e funções associadas (HSHIEH *et al.*, 2008). Portanto, com um déficit de acetilcolina, e um excesso de glutamato, noradrenalina e dopamina, o déficit de atenção e cognitivo característicos do delirium é iminente. A SFIH, sugere, em conclusão, que a falta de integração do sistema e a alteração na homeostase da neurotransmissão gera um funcionamento anormal do controle parassimpático, levando a uma cascata patológica de ativação de neuroreceptores, o que causa apoptose em diferentes áreas do cérebro e culmina nos sintomas sindrômicos causados pelo *delirium* (MALDONADO, 2017).

Figura 3 - Tipos de *delirium* e os seus desfechos clínicos



Fonte: Adaptado (MALDONADO, 2017). A figura demonstra os 5 principais tipos de delirium após um estado de período curto subsindrômico de ansiedade, impaciência e distúrbios no sono; os tipos hipoativos mistos e hiperativos e com suas formas mais graves caracterizadas por um estado catatônico ou hiperexcitado e 3 possíveis desfechos para a síndrome.

### 1.3 Modelos animais de *delirium*

De forma elementar, para um modelo animal possuir seu apelo translacional reconhecido e aceito, 4 tipos de validades com diferentes critérios são exigidos: validade de face (o modelo animal deve apresentar similaridades nos aspectos da apresentação clínica da doença), validade de construto (as raízes etiológicas de indução da patologia do modelo devem mimetizar as situações clínicas em que levam à sintomatologia observada), validade preditiva (os tratamentos específicos direcionados para tratar o distúrbio na clínica devem desempenhar resposta satisfatória de maneira similar no tratamento do modelo animal), e validade de alvo (o modelo deve demonstrar impacto nas vias fisiopatológicas reconhecidamente associadas à condição patológica) (DENAYER *et al.*, 2014). No que tange ao *delirium*, por ser uma síndrome multifatorial e complexa, é irracional esperar que haja modelo animal capaz de mimetizar todos os aspectos intrinsecamente humanos da condição. No entanto, nas últimas décadas, abordagens utilizando estruturas subjacentes de vulnerabilidade em conjunto a um fator precipitante agudo em animais de laboratório têm sido utilizadas para desenvolver importantes evidências fenotípicas comportamentais e neurobiológicas acerca do *delirium* (INOUYE; CHARPENTIER, 1996). Dessa maneira, modelos em animais podem permitir que a análise individual e detalhada de cada um dos fatores precipitantes seja feita, de forma que tratamentos e novas intervenções sejam desenvolvidos. Sabe-se, portanto, que o desenvolvimento de modelos animais que simulam a complexa rede de desarranjo neuronal causada pelo *delirium* é a peça-chave para o desenvolvimento de novos estudos com escopo no maior entendimento das vias biológicas envolvidas e no manejo dessa condição (DULKO *et al.*, 2023).

Por ser um diagnóstico clínico pautado em observações comportamentais e seus períodos de início, clímax e declínio, um desvio de comportamento tipo-delirium observado em humanos pode ser um desvio de comportamento normal para roedores. Logo, o modelo deve ser focado em características-chave importantes do *delirium* como: início agudo da condição com curso do tipo flutuante (mudança de comportamento, observados pela caixa do animal por parâmetros de memória e de atenção, de início abrupto após o contato com um precipitante experimental ou medicamentoso) (VELAGAPUDI *et al.*, 2019), inatensão [parâmetros de falta de atenção obtidos a partir da tarefa de tempo de reação em série de cinco escolhas (5-CSRTT), testes de mudança de atenção, alteração espontânea no labirinto em Y (Y-maze) e reconhecimento de novos objetos], pensamento desorganizado [atestado a partir de testes de construção de ninho, tarefa de mudança de conjunto atencional e labirinto

em T (T-maze)], diferentes níveis de consciência (baseia-se no acesso a diferentes níveis de consciência quando em frente a um estímulo evidente, esse parâmetro pode ser observado pelo teste do campo aberto, reconhecimento de novos objetos e por monitoramento da caixa), comprometimento da memória (observado por Y-maze, T-maze, reconhecimento de novos objetos) (VASULINASHORN *et al.*, 2022).

Nesse sentido, a partir das diversas hipóteses etiopatogênicas e das características-chave para um modelo animal de *delirium*, foram desenvolvidos modelos, principalmente em murinos, envolvendo os fatores precipitantes de risco como: anestesia geral, medicações anticolinérgicas (como por exemplo a escopolamina), desidratação, estresse psicológico e desafios imunoinflamatórios com lipopolissacarídeo (LPS) (WANG *et al.*, 2023).

O LPS é um dos principais constituintes da parede celular de bactérias gram-negativas, possuindo papel ímpar nos processos fisiopatológicos advindos da infecção no organismo humano, sendo uma importante endotoxina bacteriana conhecida por gerar respostas inflamatórias profundas no cérebro de camundongo a partir de ativação microglial (HOOGLAND *et al.*, 2015). Por possuir atividade endotóxica, quando o LPS é injetado de forma sistêmica no modelo animal, as *Antigen Presenting Cells* (APCs) reconhecem o LPS por meio de *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) ativando uma via de sinalização responsável pela resposta pró-inflamatória do organismo (LAIRD *et al.*, 2009). Tendo em vista a hipótese neuroinflamatória do *delirium*, diversos estudos propuseram modelos com LPS para simular a disfunção neuronal presente no delirium pós-operatório (ZIVKOVIC *et al.*, 2015). O primeiro modelo com LPS que induziu fenótipos etiopatogênicos tipo-delirium com camundongos *Swiss Webster* foi demonstrado por Fonken *et al.* em 2013, no qual foi descrito como resultado: ruptura da resposta microglial inflamatória, resposta exagerada à doença ou comportamento-doente exagerado com diminuição da atividade locomotora no dia após a exposição ao LPS (FONKEN *et al.*, 2013). No entanto, é importante ressaltar que os fenótipos de declínio cognitivo e de mudanças de humor induzidos pela aplicação de LPS podem não representar exclusivamente o *delirium*. Estudos recentes demonstraram que o LPS é capaz de gerar redução significativa nos níveis de expressão de PSD95, uma importante proteína pós-sináptica responsável por mediar neurônios excitatórios glutamatérgicos no hipocampo de camundongo. Ademais, o LPS foi capaz de gerar um desequilíbrio indireto dos receptores colinérgicos, podendo então simular um fenótipo tipo-delirium do subtipo hipoativo. (WANG *et al.*, 2023). Contudo, os modelos animais atuais que induzem os sintomas ditos como tipo-delirium permanecem incapazes de diferenciar o fenótipo tipo-delirium de possíveis efeitos adversos advindos dos fármacos ou dos procedimentos cirúrgicos potencialmente indutores do

*delirium*.

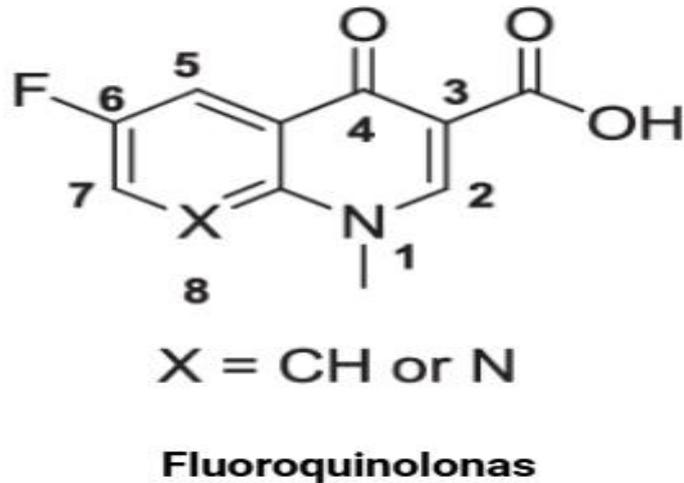
A escopolamina, por sua vez, é uma substância antagonista de receptores de acetilcolina muscarínicos que atua modulando a atividade do sistema nervoso central (SNC). Esse importante alcaloide tropânico é conhecido por seus efeitos terapêuticos na sintomatologia do enjoo e dos vômitos, assim como pelos seus efeitos adversos relacionados ao *delirium* e ao déficit cognitivo (LAKSTYGAL *et al.*, 2019). No contexto dos modelos animais para fenótipo tipo-*delirium*, a escopolamina vem sendo utilizada amplamente para indução de um *delirium* reversível de subtipo hiperativo. (WANG *et al.*, 2023).

Alguns modelos utilizando isoflurano como anestesia geral para indução de um fenótipo tipo-*delirium* foram descritos com a ajuda de softwares comportamentais observacionais inovadores (CAO *et al.*, 2023).

#### **1.4 Quinolonas: histórico, estrutura química e efeitos colaterais**

As quinolonas representam uma das mais importantes classes de antibióticos da medicina moderna (ABDEL-AAL *et al.*, 2019). São heterociclos nitrogenados ricos na natureza descobertos em 1962 de forma inesperada durante a síntese da cloroquina, sendo amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas e microrganismos resistentes (BISACCHI, 2015). No entanto, seu uso só foi difundido nos anos 80 com a descoberta de um análogo do ácido nalidíxico, a norfloxacina, possuindo um átomo de flúor na 6<sup>o</sup> posição do anel e um grupo piperazina na 7<sup>o</sup> posição do núcleo 4-quinolona, o que fez com que as propriedades farmacológicas antibacterianas da família das quinolonas fossem aprimoradas, dando espaço para o desenvolvimento de novas moléculas com características similares que hoje compõem o grupo das fluoroquinolonas (PHAM *et al.*, 2019). Essa nova família de antibacterianos, em comparação com as quinolonas, possui um espectro de ação maior, maior potência e biodisponibilidade oral, boa tolerabilidade e penetração tecidual (ABDEL-AAL *et al.*, 2019).

Figura 4 - Estrutura química geral das fluoroquinolonas



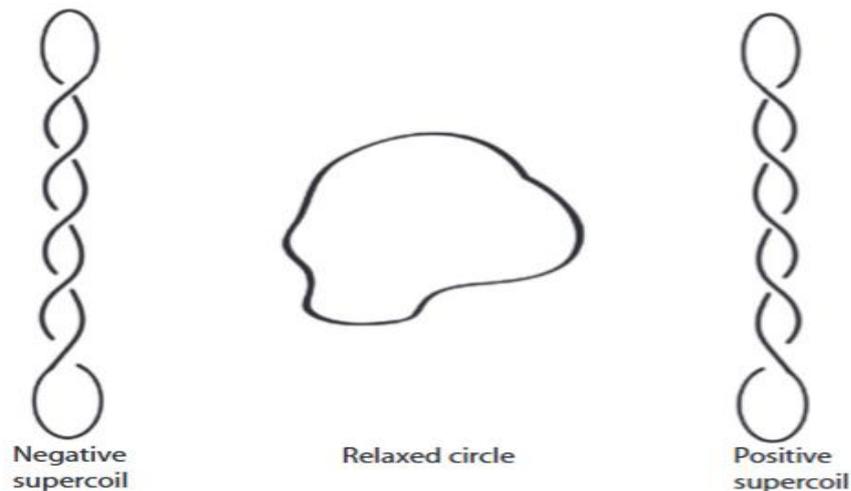
Fonte: Adaptado de Zhang *et al.*, 2018.

O DNA, um polímero imensamente comprido responsável por codificar as informações genéticas dos organismos e regular o acesso a essas informações através de mudanças na conformação do próprio polímero, em seu estado relaxado se apresenta como um círculo simples. No entanto, quando enrolado ele é retratado como uma estrutura helicoidal dupla fechada, o que impede o acesso às informações genéticas para a etapa de transcrição e replicação. Dessa maneira, é necessária a flexibilidade dessa dupla hélice de forma que ela consiga se dispor de outras conformações, o que torna a separação e reunificação dos filamentos processos essenciais para a replicação do DNA e multiplicação celular. Esse processo de flexibilidade do DNA é modulado por enzimas topoisomerases e movimentação sob complexos proteicos (WANG, 2002).

No caso de bactérias, as enzimas responsáveis pela mudança de conformação necessária para a replicação do DNA são as topoisomerases II (DNA girase) e IV. A primeira age convertendo a hélice em uma forma super-helicoidal negativa, facilitando assim tanto a compactação como a separação das cadeias em sequência de DNA importantes. A segunda promove a decatenação das super-hélices formadas durante os processos de replicação e transcrição (TRAVERS; MUSKHELISHVILI, 2015). Com isso, as quinolonas atuam como antimicrobianos a partir da captura de uma ou de ambas as enzimas da bactéria, o que produz um complexo inibitório que impede a continuação do mecanismo de replicação do material genético e subsequentemente gera rupturas nos dois filamentos de DNA, resultando na morte celular bacteriana. De forma que parte da resistência a esses antibióticos ocorre por conta da mutação nessas duas enzimas (PHAM *et al.*, 2019). Os medicamentos da classe das

fluoroquinolonas são, portanto, indicados para infecções do trato urinário (ITU), pneumonia, gastroenterite e infecções gonocócicas (BAGGIO *et al.*, 2021).

Figura 5 - Efeito da super helicidade na conformação de um pequeno círculo de DNA



Fonte: Travers; Muskhelishvili, 2015.

A respeito de sua farmacocinética, as quinolonas são bem absorvidas a partir da administração por via oral com biodisponibilidade ótima e pouco afetada por alimentação. Sua eliminação pode variar de acordo com o padrão de cada molécula de 1,5 horas até 16 horas. São bem distribuídas por todos os tecidos do corpo e algumas podem facilmente atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), com concentrações normalmente maiores nos tecidos do que no plasma sanguíneo, tendo em vista o caráter polar do sangue (TOMÉ; FILIPE, 2011).

Apesar de seus importantes usos nos tratamentos de infecções bacterianas e de seus potenciais efeitos benéficos como quimioterápicos, os medicamentos da classe das fluoroquinolonas são comumente associados com efeitos adversos neurológicos e neuropsiquiátricos, tais como dor neuropática, crises epilépticas tônico-clônicas generalizadas e *delirium* (SUTTER *et al.*, 2015).

Estudos recentes descreveram ação anti-inflamatória microglial da ciprofloxacina a partir da via de ativação de TLR4/ NF-κB (ZUSSO *et al.*, 2019). Esses achados são importantes para pressupor que o *delirium* gerado pelo uso dessas fluoroquinolonas não advém de uma inflamação proveniente desta via, mas sim provavelmente de outras redes inflamatórias e/ou de neurotransmissão prejudicada. A penetração das fluoroquinolonas de

modo geral através da BHE é baixa e pode chegar até 10% dos níveis plasmáticos no fluido cerebrospinal. No entanto, estudos experimentais demonstraram uma maior concentração do fármaco no plasma e no SNC em ratos com insuficiência renal e hepática (HARTINGER *et al.*, 2023). A estrutura química de algumas quinolonas, como ciprofloxacina e levofloxacina, são similares à estrutura química do ácido gama-aminobutírico (GABA), o que pode causar um antagonismo dos receptores gabaérgicos e levar à sinalização de ativação de receptores glutamatérgicos gerando potenciais disfunções neuronais em pessoas predispostas (NEAME, 2018). Sabe-se que a ciprofloxacina, um medicamento da família das fluoroquinolonas, possui um potencial neurotóxico e que pode modular a atividade de alguns neurotransmissores em camundongos *swiss* machos, como GABA, glutamato, acetilcolina e dopamina. No entanto, a etiologia dos efeitos adversos neuropsiquiátricos das fluoroquinolonas ainda permanece pouco elucidada, demonstrando uma necessidade de novos estudos (IBITOYE *et al.*, 2019).

### **1.5 Aspectos imunológicos do delirium, neuroinflamação e estresse oxidativo**

A relação entre o que hoje se categoriza como delirium e inflamação é algo que se debate desde a antiguidade. No *corpus hippocraticum* o conceito mais associado com o delirium é o frenite, que se refere a uma inflamação da mente e do corpo (SAKAI, 1991). A conexão fisiopatológica entre o delirium, uma síndrome reversível complexa que envolve diversas vias de desarranjo da homeostase, e a inflamação periférica é difícil de ser estabelecida já que o estado inflamatório não se inicia no cérebro. No entanto, sabe-se que, durante períodos de infecção no organismo ou lesão física, o SNC e a imunidade periférica trabalham em uma dinâmica sintonia para coordenar a resposta imune inata (CEREJEIRA *et al.*, 2014). O principal gatilho para a resposta inflamatória é o reconhecimento do organismo de padrões moleculares advindos de uma infecção (LPS por exemplo) ou de um dano tecidual (DNA extracelular livre) a partir de Pattern Recognition Receptors presentes nas APCs, como os receptores da família Toll-like (TLR) e Nod-like (NLR). Após o reconhecimento dos PAMPS, DAMPS e XAMPS, os macrófagos periféricos são recrutados para a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1, e outros mediadores que serão responsáveis por alteração na estrutura morfológica e molecular do endotélio (BARTON, 2008). Após o controle da infecção ou do dano tecidual, os mediadores anti-inflamatórios são recrutados para finalizar a resposta inflamatória e iniciar a regeneração tecidual (BARTON, 2008). Sendo um órgão essencial para a vida humana, o cérebro possui diversas vias de comunicação com o sistema imune. Além da habilidade de ativar nervos aferentes, as citocinas pró-inflamatórias

são capazes de serem transportadas ativamente através da BHE, podendo também interagir com as células endoteliais cerebrais e induzir a produção de prostaglandinas no parênquima do cérebro. Com a sinalização pró-inflamatória no sistema nervoso central, as micróglias iniciam a neuroinflamação com a reação em cadeia de produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (PERRY, 2020).

Sabe-se que o envelhecimento natural do ser humano é associado com uma mudança no perfil inflamatório do sistema nervoso central em frente a um ambiente pró-inflamatório e com alto grau de estresse oxidativo (SPARKMAN; JOHNSON, 2008). Estudos apontam que em condições basais os cérebros senescentes apresentam uma maior quantidade de micróglias com características morfológicas, funcionais e fenotípicas de um estado mais ativado que o cérebro jovem, incluindo uma maior expressão de MHC tipo II e de integrinas CD68 e CD11. Essas características fazem com que a resposta inflamatória seja maior e possivelmente exacerbada frente a um desafio imunológico (SPARKMAN; JOHNSON, 2008).

Tendo em vista a relação intrínseca da senescência com a neuroinflamação, diversos estudos utilizaram de desafios imunológicos com LPS em modelos animais, sendo observado em grande parte dos estudos níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IL-1 em camundongos adultos e uma mudança comportamental caracterizada por diminuição na locomoção, exploração social e frequência de alimentação. Os estudos feitos em camundongos idosos descrevem uma reação inflamatória ainda mais agressiva com níveis ainda maiores de citocinas pró-inflamatórias e com sintomas da síndrome tipo-doente mais severos (MCCUSKER; KELLEY, 2013). De forma significativa, concentrações maiores de mediadores inflamatórios no cérebro e a administração sistêmica de LPS implica diretamente em déficit de memória e de atenção transitória característicos de várias condições neuropsiquiátricas, incluindo o delirium (FIELD *et al.*, 2012).

Nesse contexto, o óxido nítrico (NO) é um gás altamente difusível com radicais livres produzido pela óxido nítrico sintetase (NOS), a qual possui 3 isoformas identificadas sendo elas: NOS neuronal (nNOS), NOS induzida (iNOS) e NOS endotelial (eNOS). Essas enzimas são extremamente importantes na modulação do tônus vascular, na secreção de insulina, no tônus das vias aéreas, além de serem envolvidas com angiogênese e desenvolvimento neuronal. No entanto a iNOS é a responsável por manter altos níveis de NO, o qual pode reagir com ânions superóxido em nosso corpo e gerar o ânion peroxinitrito (OONO<sup>-</sup>), que é fortemente relacionado com estresse nitrosativo e estresse oxidativo (CHONG *et al.*, 2017). Estudos recentes apontam a implicação de declínio cognitivo em camundongos com níveis aumentados de óxido nítrico e outros mediadores inflamatórios

(ZHAO *et al.*, 2019).

Estudos em humanos apontam que a complexa disfunção homeostática em um episódio de delirium ocorre devido também às alterações nos mais diversos mediadores inflamatórios e na atividade da colinesterase plasmática. Em adição a isso, sabe-se que uma resposta inflamatória aguda em conjunto à disfunção na atividade da colinesterase plasmática também está implicada no desenvolvimento do declínio cognitivo, presente também no delirium, e na fisiopatologia da demência (HOLMES *et al.*, 2009).

### **1.6 Marcadores biológicos do delirium: Neurotransmissores e proteínas importantes**

A identificação de novos marcadores biológicos para o delirium é algo essencial para facilitar o entendimento de sua ainda elusiva fisiopatologia, seu manejo, seu diagnóstico e sua prevenção. Os biomarcadores são traços biológicos ou moleculares capazes de indicar a presença ou a severidade de uma determinada condição (MARCANTONIO *et al.*, 2006). No contexto de delirium, os biomarcadores encontrados na literatura, apesar de identificados, apresentam resultados não conclusivos e conflitantes. Logo, biomarcadores específicos ainda não foram determinados para essa síndrome. No entanto, muitos neurotransmissores e outras moléculas, como melatonina, estrógeno e enzimas que catalisam a hidrólise de acetilcolina, são associados em diversos estudos ao delirium e podem ajudar no desenvolvimento de biomarcadores específicos para essa condição multifacetada (DUNNE *et al.*, 2021). No que tange à hipótese de falha nas vias de neurotransmissão, teoriza-se que um excesso de dopamina associada a uma depleção de acetilcolina pode contribuir para a sua origem, assim como contribuir significativamente com o agravamento do quadro de delirium

Sabe-se que a dopamina desempenha uma função ímpar no controle de sintomas característicos do delirium, como cognição, atenção, movimento e memória, por esse motivo muitos estudos envolvendo a fisiopatologia do delirium voltaram seus olhos para a dopamina, como também para os seus metabólitos e precursores (EGBERTS *et al.*, 2015). Estudos *in vitro* em micróglia de modelo animal de delirium induzidos por LPS mostraram que o uso de agonistas de receptores de dopamina D1 (D1R), além de administração de precursores do neurotransmissor, como a L-DOPA, em conjunto com um antagonista de receptor D4 (D4R), como a clozapina, podem levar a uma supressão da resposta inflamatória gerada pelo LPS e potencialmente tratar os sintomas advindos do modelo de delirium (NISHIKAWA *et al.*, 2023).

Nos últimos anos muito vem sendo discutido a respeito da relação entre a redução

de níveis de neurotransmissão de acetilcolina e a instalação do delirium (ZUJALOVIC; BARTH, 2015). A butirilcolinesterase e acetilcolinesterase são dois importantes tipos de enzimas responsáveis por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina e são encontradas em diversos compartimentos do organismo, sendo eles: no cérebro e outras partes do sistema nervoso central, como também nas hemácias no sistema circulatório (DAS, 2012). Sabe-se que a butirilcolinesterase pode ter sua concentração e atividade aumentada em casos de delirium pós-operatório (ADAM *et al.*, 2020). Alguns estudos subsequentes mostraram que sedativos gabaérgicos potentes, como o midazolam, possui a capacidade de aumentar a expressão intracelular de butirilcolinesterase, o que pode agravar os quadros de delirium pós-operatório a partir do excesso de hidrólise de acetilcolina (RUMP; ADAMZIK 2022). No entanto, uma revisão sistemática mostrou que as evidências que trazem *Serum Acetylcholinesterase Activity* (SAA) como um biomarcador para o delirium apresentam fatores confundidores não ajustados que impedem a relação direta da SAA com o delirium. Além disso, a ação periférica da colinesterase pode não estar relacionada diretamente com as funções colinérgicas centrais afetadas pelo delirium (DUNNE *et al.*, 2021).

A melatonina, por sua vez, é um importante hormônio produzido e secretado pela glândula pineal responsável por modular o ciclo sono-vigília e outros ciclos circadianos, além de possuir ação em outras áreas da saúde do corpo humano, como antioxidante e imunomodulador (ELLIOT; NATHANEY, 2014). Como um dos fatores precipitantes do delirium é o desarranjo no ciclo sono-vigília, foram encontrados com sucesso em muitos estudos a presença de níveis anormais de melatonina em diversos estágios do delirium, o que sugere que a melatonina possa vir a ser um bom biomarcador (PIOTROWICKZ *et al.*, 2015) (YOSHITAKA *et al.*, 2013).

Os estrógenos, importantes hormônios responsáveis também pela modulação de funções cognitivas por diversas vias, incluindo de forma neuroprotetora, podem estar relacionados com o delirium quando em altos níveis. Tendo em vista a possível relação de estrógenos e déficit cognitivo (SENANARONG *et al.*, 2002), altos níveis de estradiol (E2) séricos foram descritos em mulheres idosas hospitalizadas com incidentes de delirium (FUNES *et al.*, 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

O *delirium* é uma síndrome neuropsiquiátrica transitória e de curso flutuante com início agudo, caracterizada por disfunção cognitiva generalizada, alteração do estado de consciência e déficit de atenção (PRAYCE, 2018). A etiologia dessa condição é geralmente multifatorial (HARRISON *et al.*, 2017) e depende da interação entre a vulnerabilidade do paciente ao desenvolvimento de delirium (fatores predisponentes, substrato neurológico) e a gravidade dos fatores desencadeantes (HAN; SUYAMA, 2018).

Os medicamentos são os fatores desencadeantes mais comuns de *delirium*, representando cerca de 40% de todos os casos. Apesar de sua alta prevalência, o *delirium* muitas vezes permanece não reconhecido e não detectado em até 70% dos casos (BROWN T.M., 2000; JOSEPHSON & MILLER, 2015; HAN & SUYAMA, 2018; ODEH M. *et al.*, 2019). Entretanto, é considerado uma emergência psiquiátrica por ter uma manifestação aguda psíquica ou comportamental que representa risco iminente a integridade física do indivíduo e às pessoas em contato com o mesmo ou ao meio “in delirium”. Está associado a um maior tempo de internação, declínio funcional, taxas elevadas de institucionalização e maior morbidade e mortalidade (WITLOX *et al.*, 2010; RISSARDO & CAPRARA, 2023). Ensaios clínicos bem conduzidos revelam que 30% a 40% dos casos de *delirium* podem ser evitados através de programas multidisciplinares de prevenção e detecção precoce (MARCANTONIO, 2017).

Atualmente a literatura sobre delirium ou psicose associados ao uso de fluoroquinolonas é limitada a relatos de casos e o mecanismo preciso por trás dessa associação é desconhecido (LERTXUNDI U. *et al.*, 2013; KOGAN Y. *et al.*, 2018; BENNETT *et al.*, 2019; CHENGWEN & CHRISTOPHER, 2021). Nesse contexto, é de suma importância estudos que possam propor mecanismos e/ou fatores predisponentes dessa disfunção cerebral para auxiliar no diagnóstico e contribuir para a diminuição do número de internações e das altas taxas de morbidade e de mortalidade.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Estudar a disfunção cognitiva e sintomas do tipo delirium induzidos por levofloxacin em camundongos saudáveis e submetidos ao modelo inflamatório induzido por lipopolissacarídeo.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Investigar alterações comportamentais em camundongos tratados com levofloxacin por 10 dias bem como em camundongos submetidos ao modelo inflamatório induzido por LPS através dos seguintes testes: campo aberto, labirinto em Y, rota-rod e nado forçado;
- Determinar os níveis de estresse oxidativo após o tratamento com levofloxacin em camundongos saudáveis, assim como em camundongos submetidos ao modelo inflamatório por LPS, através da formação de nitrito-nitrato, glutatona reduzida (GSH) e malonaldeído (MDA) nas áreas cerebrais córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado;
- Determinar as concentrações de monoaminas e aminoácidos (GABA e Glutamato) após o tratamento com levofloxacin em camundongos saudáveis, assim como em camundongos submetidos ao modelo inflamatório por LPS nas áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado);
- Avaliar o efeito do tratamento com levofloxacin sobre a resposta inflamatória em camundongos saudáveis e submetidos ao modelo inflamatório por LPS por meio da dosagem de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no soro;
- Investigar alterações histopatológicas em camundongos saudáveis tratados com levofloxacin por 10 dias e em camundongos submetidos ao modelo inflamatório por LPS no 9º dia de tratamento;
- Avaliar o efeito do tratamento com levofloxacin sobre a reatividade astrocitária através da marcação de GFAP, por meio de imunohistoquímica, em hipocampus de camundongos saudáveis e submetidos ao modelo inflamatório por LPS;

- Avaliar o efeito do tratamento com levofloxacina sobre a resposta inflamatória e ativação glial através da marcação de Iba-1, por meio de imunohistoquímica, em hipocampo de camundongos saudáveis e submetidos ao modelo inflamatório por LPS.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade *Swiss*, machos, adultos, pesando entre 22-26g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram acondicionados em caixas de propileno  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água “*ad libitum*”.

Todo o procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, sob número 4237120522. Os protocolos experimentais seguiram os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 4.2 Drogas

As substâncias descritas a seguir foram administradas no volume de 0,1 mL/10g de peso do animal. O meio de dissolução foi solução fisiológica 0,9%.

Tabela 1 - Drogas utilizadas

<b>Drogas</b>	<b>Concentrações</b>	<b>Via</b>
Levofloxacina (Cayman Chemical)	100 e 150 mg/Kg	Intraperitoneal (i.p.)
Escopolamina (Sigma-Aldrich®)	1,5 mg/kg	Intraperitoneal (i.p.)
Lipopolissacarídeo – LPS (Santa Cruz)	0,5 mg/kg	Intraperitoneal (i.p.)

Fonte: Elaborada pelo autor.

### Cálculo das Drogas

As doses foram convertidas para camundongos de acordo com a literatura (REAGAN-SHAW *et al.*, 2007). As doses de 100 e 150 mg/kg correspondem a 500 mg e 750 mg em humanos, respectivamente.

$$\text{HED (mg/Kg)} = \text{Animal Dose (mg/Kg)} \times \frac{\text{Animal Km}}{\text{Human Km}}$$

HED = Human Equivalent Dose

KM Camundongo = 3

KM Humano = 37 (adulto 60Kg)

✓ **DOSE 1**

**500 mg** (Levofloxacin) – 8,33 mg/Kg

$$8,33 \text{ mg/Kg} = \text{Dose Animal (mg/Kg)} \times \frac{3}{37}$$

Dose Animal = 102,75 mg/Kg

Logo: **Dose 1 = 100 mg/Kg**

✓ **DOSE 2**

**750 mg** (Levofloxacin) – 12,5 mg/Kg

$$8,33 \text{ mg/Kg} = \text{Dose Animal (mg/Kg)} \times \frac{3}{37}$$

Dose Animal = 154,13 mg/Kg

Logo: **Dose 2 = 150 mg/Kg**

## **Tratamento**

Os animais foram tratados com Levofloxacin nas doses de 100 ou 150 mg/Kg e Escopolamina 1,5 mg/Kg, administrados por via intraperitoneal, durante 10 dias. O grupo controle foi tratado com solução salina (NaCl, 0,9%). No 9º dia do tratamento, duas horas após a administração das drogas, metade dos animais receberam Lipopolissacarídeo na dose de 0,5 mg/Kg, via intraperitoneal, enquanto a outra metade foi tratada com o veículo (NaCl 0,9%).

As doses utilizadas, assim como o tempo de tratamento, simulam o que ocorre na clínica. No entanto, a via de administração é diferente, mas não compromete os resultados, visto que estudos farmacocinéticos realizados em camundongos, demonstraram que a Levofloxacin é capaz de ultrapassar a barreira hemaencefálica – BHE (NORRBY, 1999).

Tabela 2 - Grupos Experimentais

	<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Droga Utilizada</b>
(1)	SAL	Salina 0,9%
(2)	LEV 100	Levofloxacina 100 mg/Kg + Salina 0,9%
(3)	LEV 150	Levofloxacina 150 mg/Kg + Salina 0,9%
(4)	ESC	Escopolamina 1,5 mg/Kg + Salina 0,9%
(5)	SAL + LPS	Salina 0,9% + LPS 0,5 mg/Kg
(6)	LEV 100 + LPS	Levofloxacina 100 mg/Kg + LPS 0,5 mg/Kg
(7)	LEV 150 + LPS	Levofloxacina 150 mg/Kg + LPS 0,5 mg/Kg
(8)	ESC + LPS	Escopolamina 1,5 mg/Kg + LPS 0,5 mg/Kg

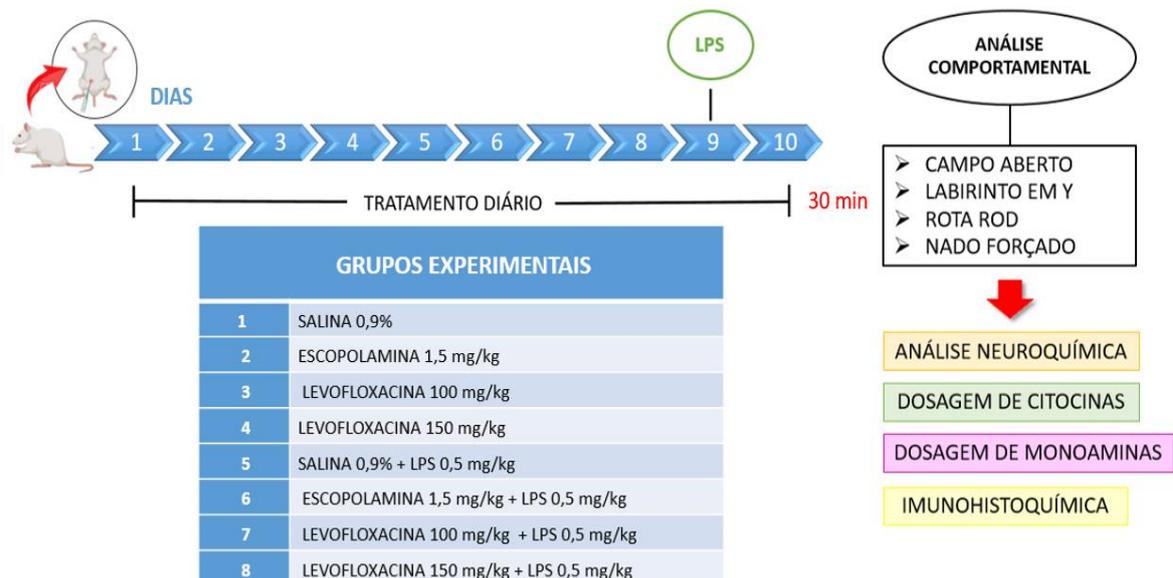
Fonte: Elaborada pelo autor.

**SAL** – Salina; **LEV** – Levofloxacina; **ESC** – Escopolamina; **LPS** – Lipopolissacarídeo.

### 4.3 Delineamento Experimental

O fluxograma abaixo resume como foi realizado o procedimento experimental.

Figura 6 - Procedimento Experimental



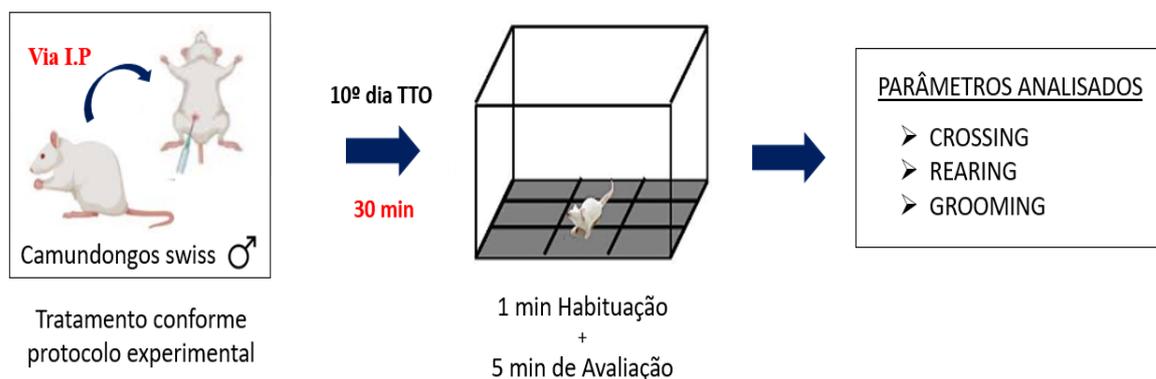
Fonte: Elaborada pelo autor.

## 4.4 Testes Comportamentais

### 4.4.1 *Campo Aberto*

O teste do campo aberto foi realizado utilizando-se um aparato de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm; dividido em 9 quadrantes iguais), com o objetivo de avaliar a atividade locomotora do animal (ARCHER, 1973). Foram investigados os seguintes parâmetros: número de cruzamentos, número de comportamentos de autolimpeza (grooming) e número de explorações verticais (rearing), registrados durante um tempo de 5 minutos, após 1 minuto de adaptação/habituação, por um observador cego ao tratamento dado a cada animal.

Figura 7 - Teste do Campo Aberto



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 4.4.2 *Nado Forçado*

O teste do Nado Forçado foi realizado de acordo com o modelo de Porsolt *et al.*, (1978). Os animais foram colocados em um cilindro acrílico, transparente, com água, e a duração total da imobilidade (em segundos) foi registrada durante um tempo de 5 minutos, após 1 minuto de adaptação, por um observador cego ao tratamento dado a cada animal. O camundongo foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando passivamente, podendo fazer leves movimentos para manter a cabeça fora da água.

Figura 8 - Teste do Nado Forçado



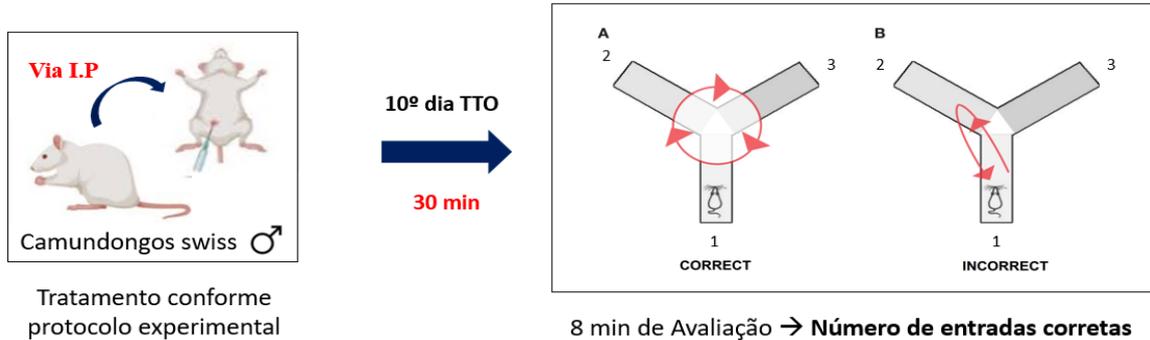
Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4.3 Labirinto em Y

A memória de trabalho foi avaliada por meio do teste de labirinto em Y (SARTER; BODEWITZ; STEPHENS, 1988). O labirinto consiste em três braços idênticos (A, B, C) de 40 cm de comprimento, 25 cm de altura e 6 cm de largura, cada um convergindo a ângulos iguais. Cada camundongo foi colocado na extremidade de um braço e deixado para explorar o ambiente por oito minutos. A sequência dos braços em que os animais entraram foi então anotada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entrada nos braços sem repetição. Uma alternância foi considerada correta se o animal visitou um novo braço e não retornou ao braço anteriormente visitado. Por exemplo, se o animal fez o trajeto ABCACBACCAB, o número de entradas será 11 e as alternâncias corretas ABC, BCA, ACB, CBA, BAC, CAB. Portanto, a porcentagem de alternâncias corretas, de acordo com a fórmula abaixo, será  $[6/(11 - 2)] \times 100 = 66,7\%$ .

$$\text{Alternâncias corretas (\%)} = \frac{\text{alternâncias corretas}}{\text{número total de entradas} - 2} \times 100$$

Figura 9 - Teste do Labirinto em Y

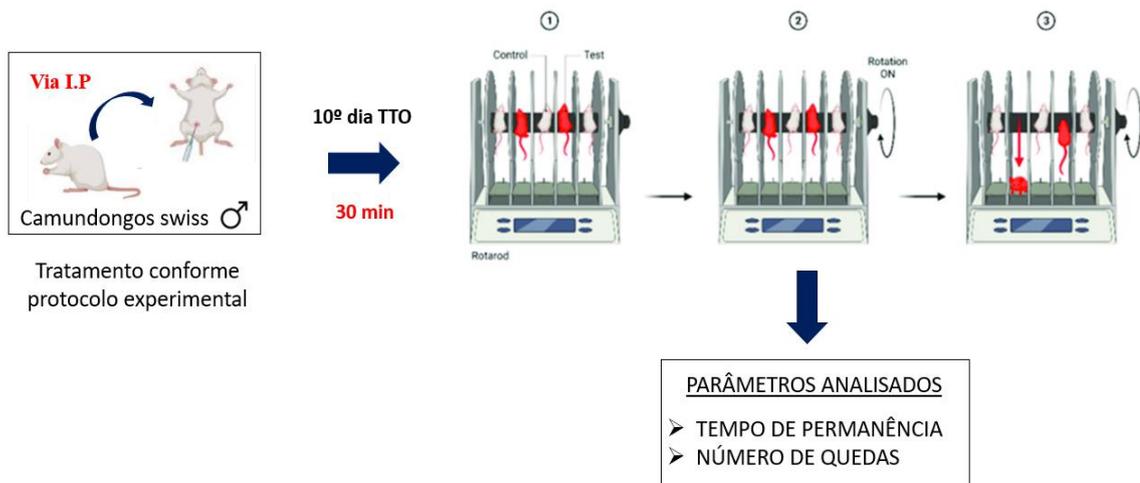


Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4.4 Rota-Rod

O teste do Rota Rod mensura o efeito do relaxamento muscular ou distúrbio da coordenação motora induzidos pela ação de drogas em animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Para este teste, os camundongos foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 12 rpm, por um período de 1 minuto. Foram registrados o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s), e o número de quedas (DUNHAM; MIYA, 1957).

Figura 10 - Teste do Rota-Rod



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 4.5 Testes Neuroquímicos

### 4.5.1 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

#### 4.5.1.1 Determinação dos níveis de nitrato/nitrito

Para avaliar os efeitos de tratamentos com as respectivas substâncias na produção de NO, foram determinados os níveis de nitrito nos homogenatos, pelo método de Green et al. (1981). Para esse experimento 100 µL do Reagente de Griess (ácido fosfórico 5%, sulfonilamida 1% em ácido fosfórico 5%, NEED 0,1% e água destilada) foram adicionados a 100 µL do sobrenadante do homogenato e incubados a temperatura ambiente por 10 min.

A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO<sub>2</sub> (variando de 0,75 a 100 mM) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100 µL do Reagente de Griess a 100 µL do tampão usado para o homogenato (fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4). A absorbância foi medida em leitor de microplacas em 540 nm, e o resultado expresso em nmol de nitrito/g de tecido.

#### 4.5.1.2 Avaliação da peroxidação lipídica

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais foi medido através da determinação dos níveis de malonildialdeído (MDA), conforme o método de Huong *et al.*, (1998), seguindo o protocolo a seguir. Foram preparados os homogenatos das áreas cerebrais a 10% em tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4 e 63µL destes foram adicionados a 100 µL de ácido perclórico 35% em tubos *ependorf*, que foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida 150 µL do sobrenadante foram adicionados a 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, que ficaram em banho-maria a 95°C por 30 minutos. Por fim, 150 µL da mistura foram adicionados aos poços da placa de ELISA e, posteriormente, foi feita a leitura a 535nm. Os resultados foram expressos em µg de MDA/g de tecido.

#### 4.5.1.3 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram avaliados para estimar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com

grupos tiol livres. Foram retirados 400µL do homogenato e adicionados a 320µL de água destilada e mais 80µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida foram recolhidos 400µL do sobrenadante e acrescidos 800µL de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e mais 20µL de DTNB 0,01M aos poços da placa de ELISA e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração a 412nm (SEDLAK; LINDSAY, 1968). A concentração de glutatona reduzida foi expressa em µg de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão.

#### ***4.5.2 Determinação de monoaminas e aminoácidos***

Para a detecção dos níveis de catecolaminas foi utilizado o equipamento de HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) por detecção eletroquímica, como descrito previamente por Aguiar e colaboradores (2006).

Os tecidos foram homogeneizados a 10% em ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) por 30 (trinta) segundos, sendo em seguida centrifugados na temperatura de 4°C por 15 (quinze) minutos a 15000 rpm. O sobrenadante foi separado e filtrado através de uma membrana de 0,2 µm (Millipore®). Uma alíquota de 20µL foi injetada no equipamento de HPLC, sendo utilizada uma coluna CLC-ODS (M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 cm e diâmetro da partícula de 3 µm (Waters®, Estados Unidos da América). A fase móvel utilizada é composta por tampão ácido crítico 0,163 M, pH 3,0 contendo ácido octanosulfônico sódico 0,69 M (SOS) como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4% v/v e tetrahydrofurano 1,7% v/v.

A dopamina (DA) e o seu metabólito ácido diidroxifenilacético (DOPAC), o ácido gama-aminobutírico (GABA) e o glutamato foram eletroquimicamente detectados usando um detector eletroquímico 2465 (Waters®, Modelo Alliance, Estados Unidos da América) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl. As concentrações das amostras foram calculadas a partir da área dos picos dos padrões utilizados, e os resultados expressos em ng/mg de tecido.

#### ***4.5.3 Determinação dos níveis de IL-1β e TNF-α***

As citocinas inflamatórias IL-1β e TNF-α foram quantificadas por ensaio colorimétrico de ELISA (BD Biosciences, San Diego, CA, Estados Unidos), utilizando o soro dos camundongos. Placas de microtitulação de poliestireno (96 poços – NUNC/Maxisorp)

foram sensibilizadas com anticorpos específicos de captura diluídos em tampão carbonato de sódio pH 9,5 ou fosfato de sódio pH 6,5 e incubados a 4 °C overnight. Após esse período as placas foram lavadas com PBS tween 0,05%. Os poços foram então bloqueados com PBS 10% soro fetal e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. Depois a placa foi lavada quatro com PBS tween e os recombinantes respectivos adicionados em diluições seriadas, e as amostra adicionadas, em duplicatas e incubadas em temperatura ambiente por duas horas. Os poços foram lavados novamente com PBS tween. Após lavagem, adicionou-se o anticorpo secundário (de detecção) diluído, e incubou-se por uma hora em temperatura ambiente e depois lavamos oito vezes com PBSt. Adicionou-se a avidina conjugada a peroxidase na diluição de 1:250 em PBS 10% soro fetal. A placa então foi incubada 30 minutos em temperatura ambiente e depois lavada novamente com PBSt. Depois de adicionado o substrato TMB e peróxido de hidrogênio, incubou-se a placa por cerca de 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2N, a leitura feita em leitor de ELISA com filtros de 450 nm e 570 nm e o resultado expresso por pg/g tecido.

#### **4.6 Análise Histopatológica**

Amostras de cérebros foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas e processados para inclusão em parafina. Após a inclusão em parafina, os segmentos cerebrais foram cortados em micrótomo, obtendo-se espessuras de 5µm. Em seguida, os cortes cerebrais foram pescados em lâminas histológicas e submetidas ao aquecimento e impregnação em estufa a 60°C por 30min. As amostras foram desparafinizadas em três sequências de xileno (P.A.), três sequências de etanol 99,9%, e hidratadas em água corrente. Ao final desta etapa, as amostras foram submersas em um banho de água destilada para assim receber o primeiro corante, a hematoxilina. As lâminas ficaram imersas no corante por 5 minutos. Em seguida, as seções foram lavadas água corrente e logo após uma passada em água destilada para o próximo corante eosina Y por 1 minuto. As seções seguiram em três etapas de desidratação em álcool etílico 99,9%, depois em mais três etapas de Xileno (P.A.), para clarificação, e por último, montagem com lamínula e Bálsamo do Canadá para preservação e melhor visualização das alterações histopatológicas sob microscópio óptico.

#### **4.7 Imunohistoquímica para GFAP e Iba-1**

Amostras de cérebros foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas e processados para inclusão em parafina. Após a inclusão em parafina, os segmentos cerebrais foram cortados em micrótomo, obtendo-se espessuras de 5µm. Em seguida, os cortes cerebrais foram inseridos em lâminas histológicas e submetidas ao aquecimento e impregnação em estufa a 60°C por 30 minutos. As amostras foram desparafinizadas em três sequências de xileno (P.A.), três sequências de etanol 99,9%, e hidratadas em água corrente. Ao final desta etapa, as amostras foram submersas em um banho de água destilada por 10 minutos. Foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (DAKO, pH 9,0) por 20 min na estação PT Link a 99°C. Em seguida, os tecidos foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) por 5 minutos. Na etapa seguinte, foi realizado o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio (Dako) por 30 minutos. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com wash buffer e incubadas com os anticorpos primários (anti-GFAP ready-to-use Dako; e anti-Iba-1 1:400; Cell signaling) por 20 minutos. Após este período, os cortes foram lavados três vezes com wash buffer e incubados com polímero HRP (DAKO) por 30 min. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes com wash buffer durante três minutos cada, secadas e aplicado o cromógeno DAB+. Dessa forma, as lâminas foram observadas até aparecer a coloração desejada. Em seguida, a reação foi parada imediatamente mergulhando-as em água destilada. Por fim, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e feito a montagem com lamínulas. Os dados foram semi-quantificados com o software ImageJ, NIH, USA (HSU; RAINE; FANGER, 1981).

#### **4.8 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism for Windows (versão 10.0, San Diego, EUA). Os dados dos testes comportamentais e neuroquímicos foram expressos como média ± E.P.M e foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da amostra. As análises foram realizadas por two-way ANOVA (análise de variância), usando como fatores “modelo LPS” (grupos LPS ou grupos SAUD/VEI) e “tratamento” (ESC, LEV 100, LEV 150), seguido pelo teste de Tukey (post

hoc). Para análise histopatológica as colunas representam a média  $\pm$  EPM, dos escores microscópicos, analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

O critério de significância utilizado foi  $p < 0,05$ . Os asteriscos (\*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) caracterizam o grau de significância quando comparados ao grupo controle de seu próprio grupo, já as letras (**c**  $p < 0,05$ ; **b**  $p < 0,01$ ; **a**  $p < 0,001$ ) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); ao comparar as doses de levofloxacino (100 e 150 mg/kg) e escopolamina (1,5 mg/kg) entre si, utilizou-se o símbolo “jogo-da-velha” (#  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação comportamental

#### *5.1.1 Efeito da administração da levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina sobre a atividade locomotora e comportamentos ansiedade-símile no teste do campo aberto em camundongos*

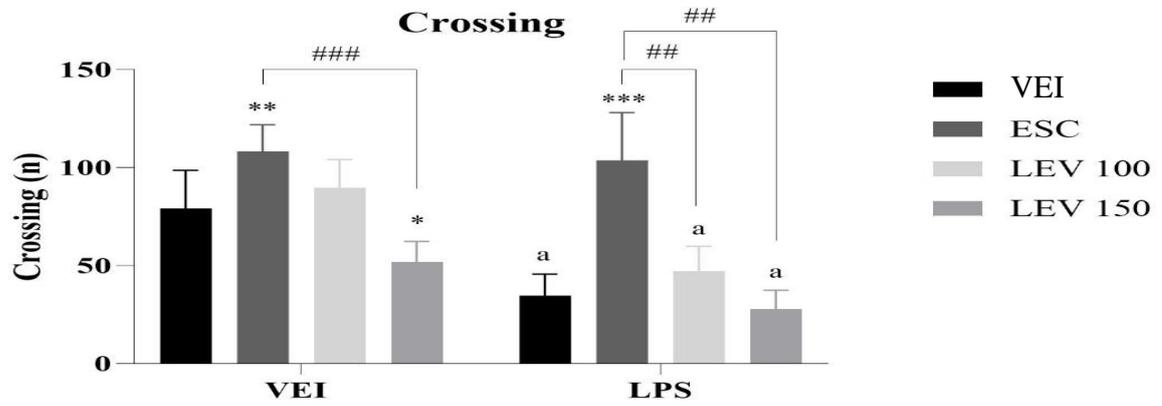
A análise do número de crossings no teste de campo aberto por two-way ANOVA revelou uma interação significativa entre os fatores “desafio com LPS” e “tratamento” [F (3, 56) = 5,980, p = 0,0013]. A este respeito, observou-se uma redução no número de crossings no grupo LPS+VEI em relação ao controle (VEI+VEI), LPS+LEV100 em relação ao seu controle VEI+LEV100 e LPS+LEV150 em relação ao seu controle VEI+LPS150 (todos com p <0,001). Houve ainda redução desse parâmetro no grupo VEI+LEV150 comparando-se ao controle (VEI+VEI). Por outro lado, os grupos tratados com escopolamina apresentaram aumento de crossings em relação aos seus controles (ESC+VEI x VEI +VEI: p<0,01 e LPS+ESC x LPS+VEI: p<0,001) (FIGURA 11A).

A análise do número de rearings mostrou aumento desse parâmetro no grupo LPS+ESC em relação ao controle LPS+VEI (p<0,001) [F (3, 56) = 0,9075, p = 0,4433] (FIGURA 11B).

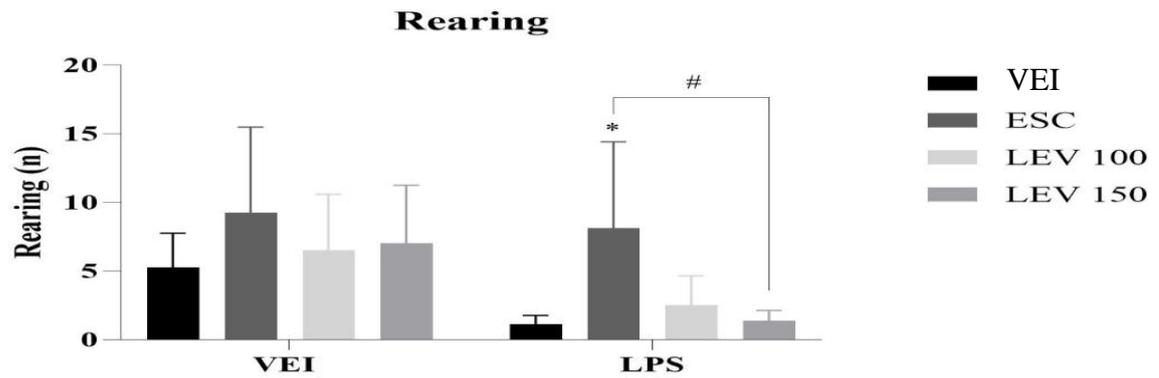
Por fim, na análise do número de groomings, observou-se uma redução deste parâmetro no grupo LPS+ESC em relação ao grupo VEI+ESC (<0,01) [F (3, 56) = 0,6867, p = 0,5640] (FIGURA 11C).

Figura 11 - Efeito da administração de levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina sobre a atividade locomotora e comportamentos ansiedade-símile no teste do campo aberto em camundongos

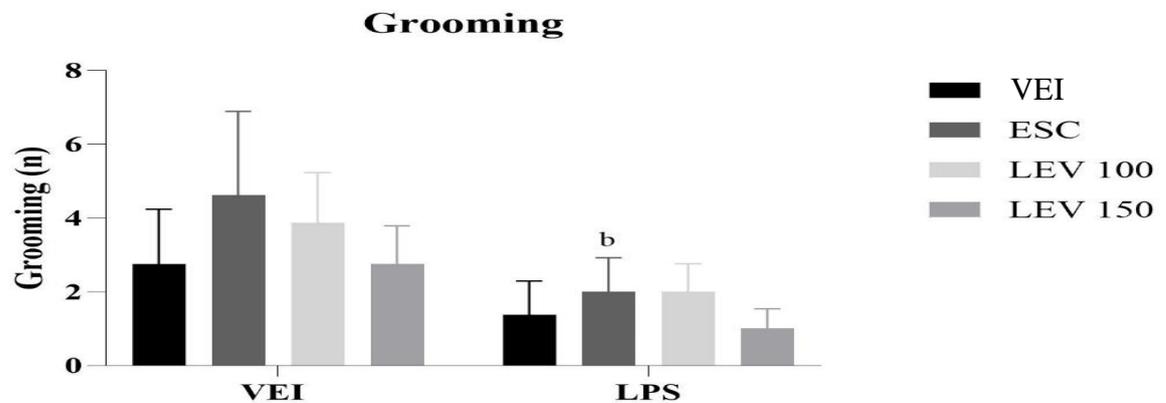
A.



B.



C.

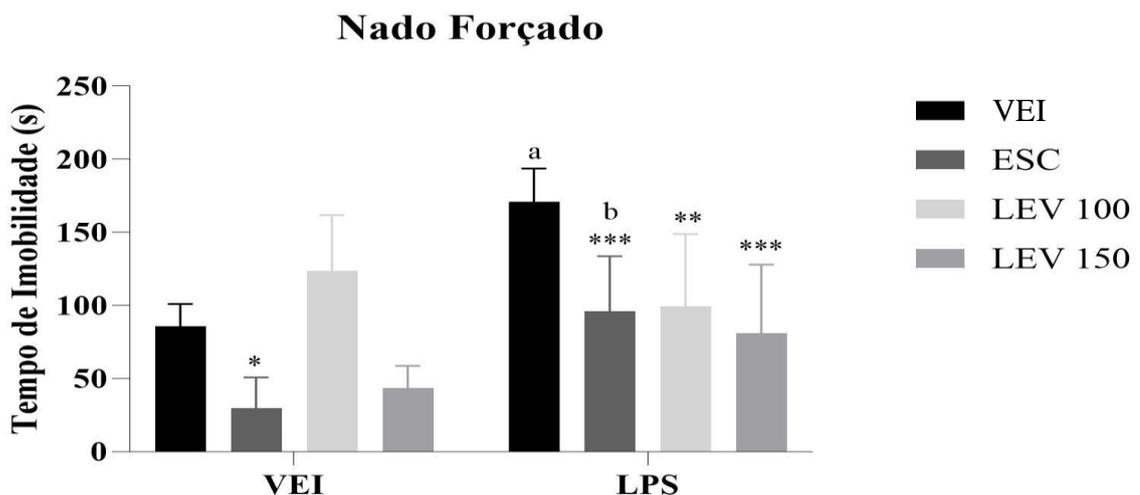


Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<,0001 vs controle. #p <0,05, ##p<0,01; ###p<0,001 grupo vs grupo. As letras (c p < 0,05; b p < 0,01; a p < 0,001) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

### 5.1.2 Efeito da administração de levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos

A análise do tempo de imobilidade por two-way ANOVA demonstrou uma interação significativa entre os fatores [F (3, 66) = 8,198, P =0,0001]. O LPS aumentou o tempo de imobilidade em relação ao grupo controle (VEI+VEI) (p<0,001) e o grupo LPS+ESC em relação a VEI+ESC (p<0,01). Nos grupos desafiados com LPS, o tratamento com ESC, LEV100 e LEV150, por sua vez, reverteu esse aumento (p<0,001, p<0,01 e p<0,001, respectivamente, versus LPS+VEI). Por fim, o grupo VEI+ESC também apresentou redução do tempo de imobilidade em relação ao grupo controle (VEI+VEI) (p<0,001), como mostrado na Figura 12.

Figura 12 - Efeito da administração de levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos

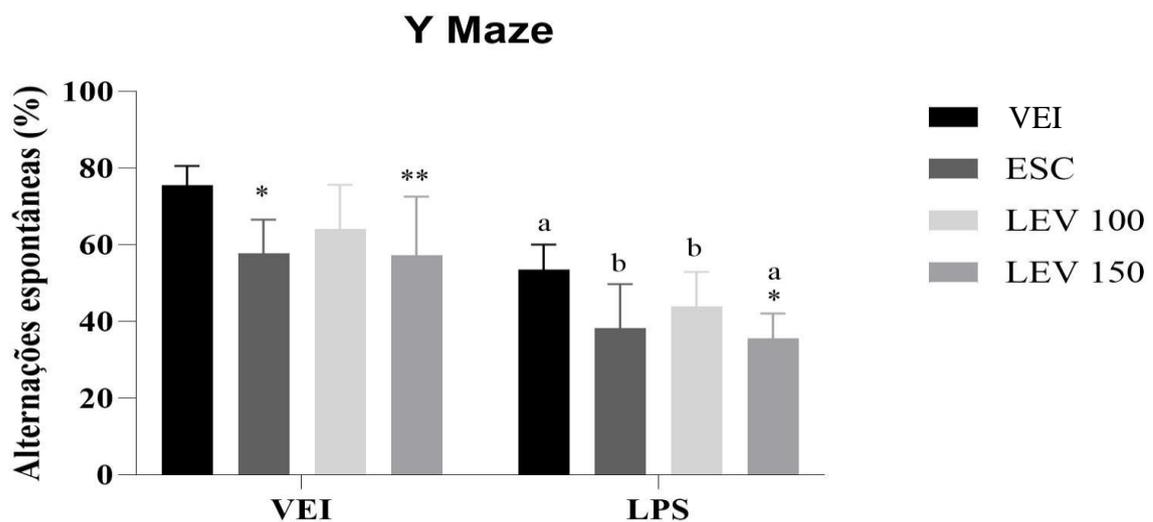


Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<,0001 vs controle. #p <0,05, ##p<0,01; ###p<0,001 grupo vs grupo. As letras (c p < 0,05; b p < 0,01; a p < 0,001) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

### 5.1.3 Efeito da administração de levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina sobre as alternâncias corretas no labirinto em Y em camundongos

Na Figura 13, pode-se observar que o LPS levou à redução na porcentagem de alternâncias corretas em relação aos controles (LPS+VEI x VEI+VEI p<0,001; LPS+ESC x VEI+ESC p<0,01; LPS+LEV100 x VEI+LEV100 p<0,01; LPS+LEV150 x VEI+LEV150 p<0,001). Essa redução também ocorreu nos grupos VEI+ESC (p<0,05) e VEI+LEV150 (p<0,01) em relação ao grupo VEI+VEI e no grupo LPS+LEV150 em relação ao LPS+VEI, apresentando  $F(3,56)=0,0613$ ,  $p=0,9799$ ), como mostrado na Figura 13.

Figura 13 - Efeito da administração de levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina sobre as alternâncias corretas no labirinto em Y em camundongos

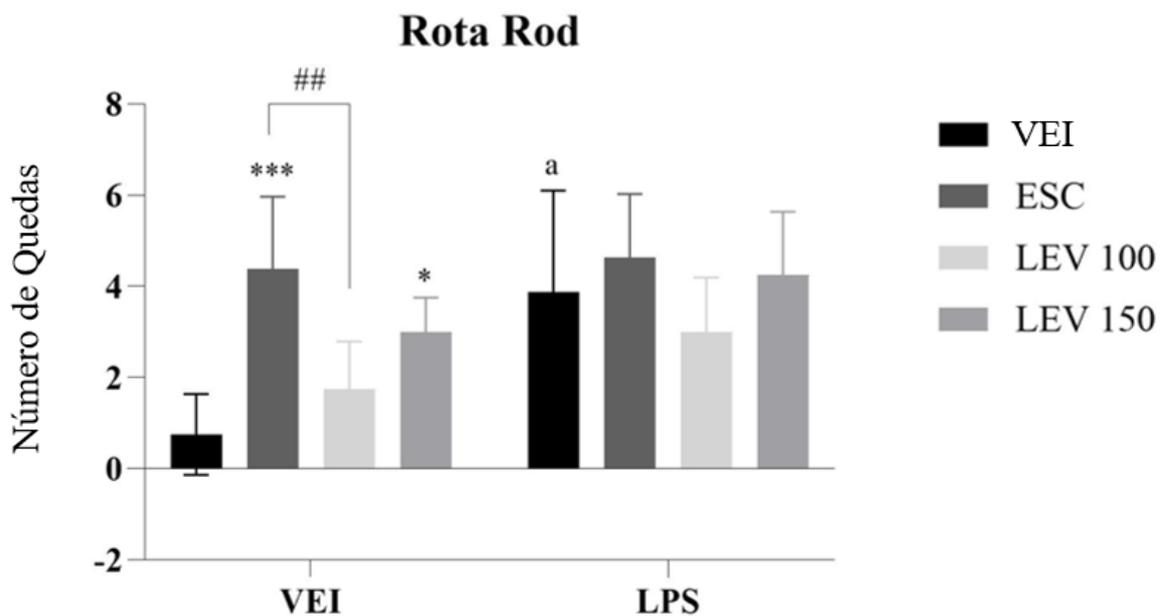


Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<,0001 vs controle. #p <0,05, ##p<0,01; ###p<0,001 grupo vs grupo. As letras (c p < 0,05; b p < 0,01; a p < 0,001) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

#### 5.1.4 Efeito da administração de levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina em camundongos sobre o número de quedas em barra giratória

Na Figura 14, pode-se observar que o LPS levou a um aumento do número de quedas em relação ao controle veículo (LPS+VEI x VEI+VEI p<0,001). A escopolamina também foi capaz de aumentar o número de quedas em relação ao veículo, assim como a levofloxacina na dose de 150 mg/kg (VEI+ESC x VEI+VEI p<0,001; VEI+VEI x VEI+LEV150 p<0,05), apresentando  $F(3,56)=3,014$ ,  $p=0,0375$ ), como mostrado na figura abaixo.

Figura 14 - Efeito da administração de levofloxacina (100 e 150 mg/kg) e escopolamina em camundongos sobre o número de quedas em barra giratória



Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<,0001 vs controle. #p <0,05, ##p<0,01; ###p<0,001 grupo vs grupo. As letras (c p < 0,05; b p < 0,01; a p < 0,001) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

## 5.2 Avaliação Neuroquímica

### 5.2.1 Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de nitrato/nitrito em camundongos

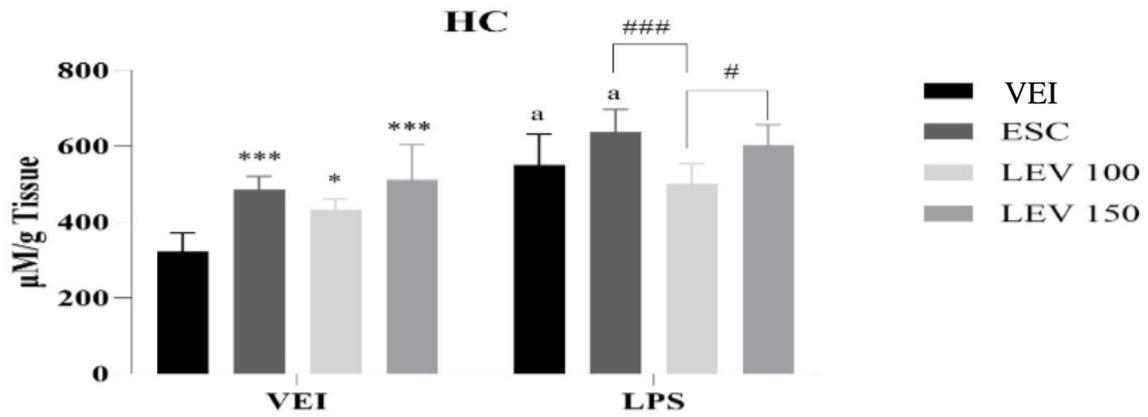
A análise dos níveis de nitrito por two-way ANOVA no hipocampo demonstrou uma interação significativa [F (3, 56) = 5,662, p =0,0018] entre os fatores “desafio com LPS” e “tratamento”. Os grupos LPS+VEI e LPS+ESC apresentaram níveis aumentados de nitrito (p<0,001) comparados aos seus respectivos controles (VEI+VEI, VEI+ESC). Foi observado aumento de nitrito com a elevação da dose de LEV no grupo LPS (LPS+LEV150>LPS+LEV100, p<0,05). Além disso, pode-se observar que tanto a escopolamina, como a levofloxacina nas duas doses (100 e 150mg), *per si*, aumentaram a concentração de nitrito em relação ao grupo que recebeu somente veículo (p<0,001, p<0,05 e p<0,001, respectivamente), conforme mostrado na Figura 14A.

No corpo estriado também foi observada interação significativa [F (3, 56) = 4,005, p =0,0118] entre os fatores, com aumento de nitrito com a administração do LPS em relação ao controle sadio (p<0,05) e do grupo LPS+LEV150 em relação ao VEI+LEV150 (p<0,001). Além disso, a escopolamina sozinha também apresentou níveis aumentados comparando-se ao grupo VEI+VEI (p<0,05), como pode ser visto na Figura 14B.

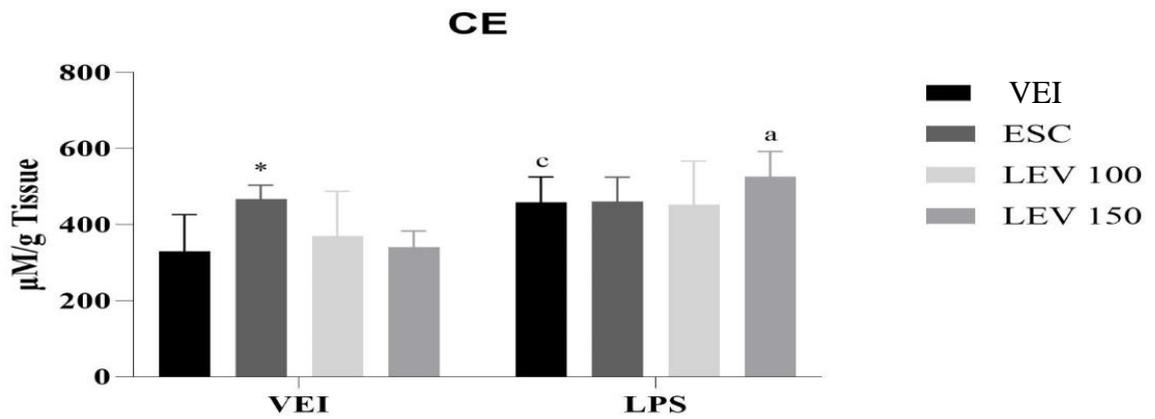
Da mesma forma que aconteceu nas outras áreas cerebrais, no CPF, a interação entre os fatores foi significativa [F (3, 56) = 4,974, p =0,0040], onde o grupo LPS+VEI teve aumento dos níveis de nitrito comparando-se ao controle VEI+VEI (p<0,001), bem como o grupo LPS+LEV150 em relação ao seu controle (VEI+LEV150) (p<0,05). Os grupos sadios com administração de ESC, LEV 100 e LEV150 também tiveram aumento da concentração de nitrito em relação ao grupo VEI+VEI (p<0,01, p<0,05 e p<0,01, respectivamente), conforme Figura 14C.

Figura 14 - Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de nitrito no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos

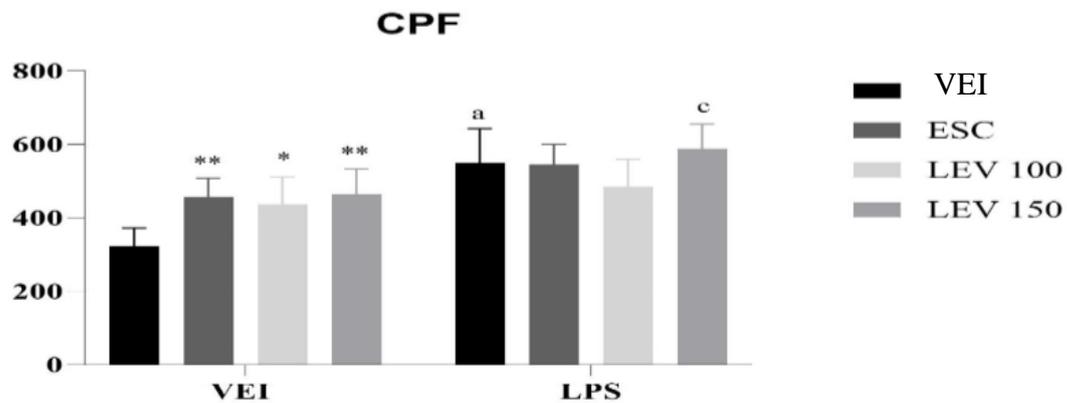
A.



B.



C.



Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<,0001 vs controle. #p <0,05, ##p<0,01; ###p<0,001 grupo vs grupo. As letras (c p < 0,05; b p < 0,01; a p < 0,001) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

### ***5.2.2 Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de MDA em camundongos***

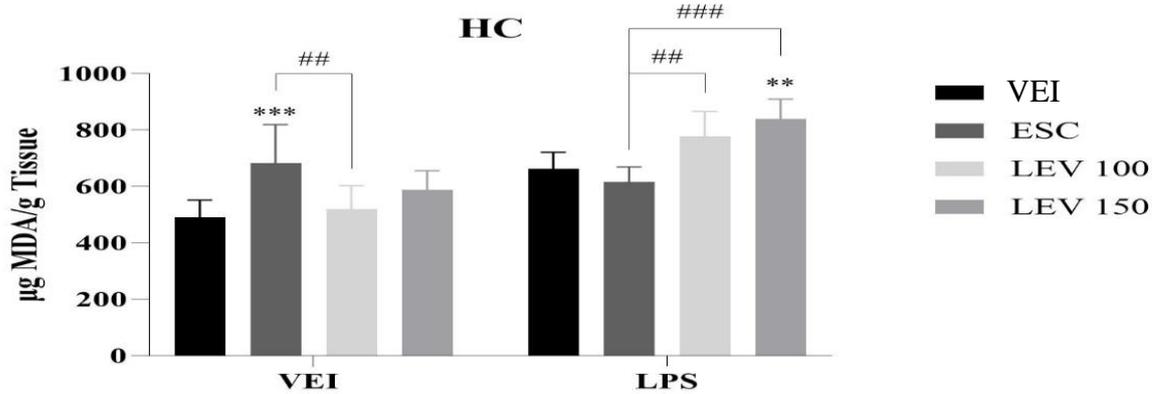
A análise dos níveis de MDA por two-way ANOVA no hipocampo demonstrou uma interação significativa entre os fatores [F (3, 56) = 14,05, p <0,0001]. Os grupos LPS+VEI, LPS+LEV100 e LPS+LEV150 apresentaram níveis aumentados de MDA comparados aos seus respectivos controles (VEI+VEI, VEI+LEV100 e VEI+LEV150, com p<0,01, p<0,001 e p<0,001, respectivamente) e o grupo LPS+LEV150 em relação ao LPS+VEI (p<0,01). Além disso, pode ser visto na Figura 15A que a escopolamina sozinha aumentou os níveis de MDA do hipocampo, comparando-se ao grupo VEI+VEI (p<0,001).

No corpo estriado também foi observada interação significativa [F (3, 56) = 9,264, p<0,0001] entre os fatores, com aumento de MDA com a administração do LPS em relação ao controle sadio (p<0,001) e do grupo LPS+LEV100 em relação ao VEI+LEV100 (p<0,001). Pode-se ainda observar que, no CE, os grupos sadios com administração de ESC e LEV150 tiveram aumento da concentração de MDA em relação ao grupo VEI+VEI (p<0,001 e p<0,05, respectivamente), como mostrado através da Figura 15B.

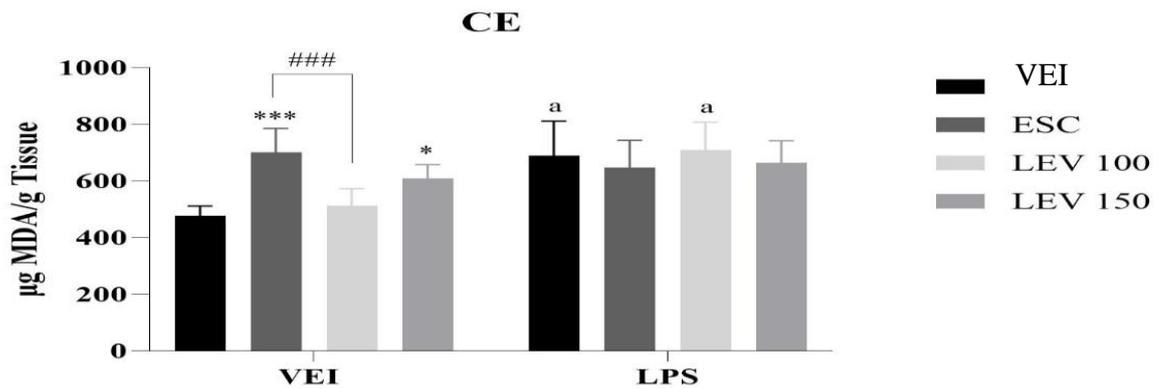
Por fim, no CPF (FIGURA 15C) também foi observado aumento significativo dos níveis de MDA no grupo LPS+VEI em relação ao controle VEI+VEI (p<0,01), LPS+LEV100 em relação ao seu controle VEI+LEV100 (p<0,001) e LPS+LEV150 em relação ao VEI+LEV150 (p<0,001). Além disso, foi observado aumento de MDA do grupo LPS+LEV150 em relação aos grupos LPS+VEI (p<0,001) e LPS+LEV100 (p<0,05) [F (3, 56) = 1,288, p=0,2874].

Figura 15 - Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de MDA no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos

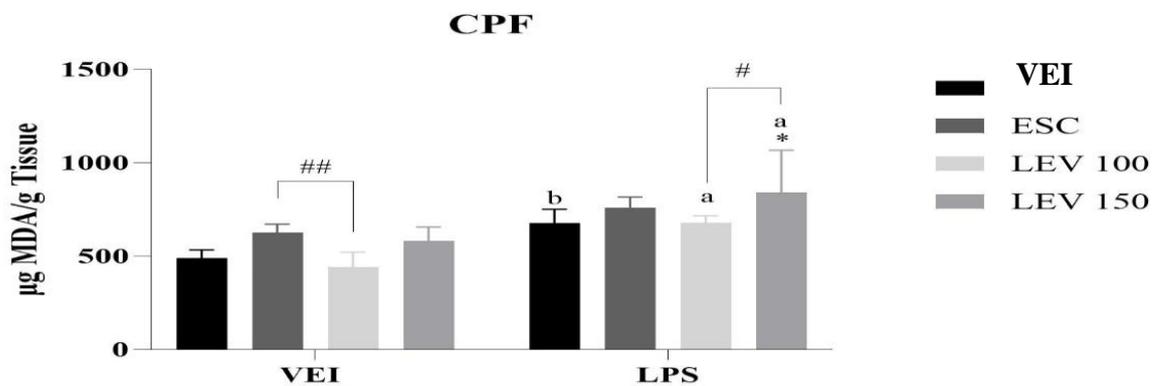
A.



B.



C.



Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<,0001 vs

controle. #p <0,05, ##p<0,01; ###p<0,001 grupo vs grupo. As letras (c p < 0,05; b p < 0,01; a p < 0,001) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

### ***5.2.3 Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de GSH em camundongos***

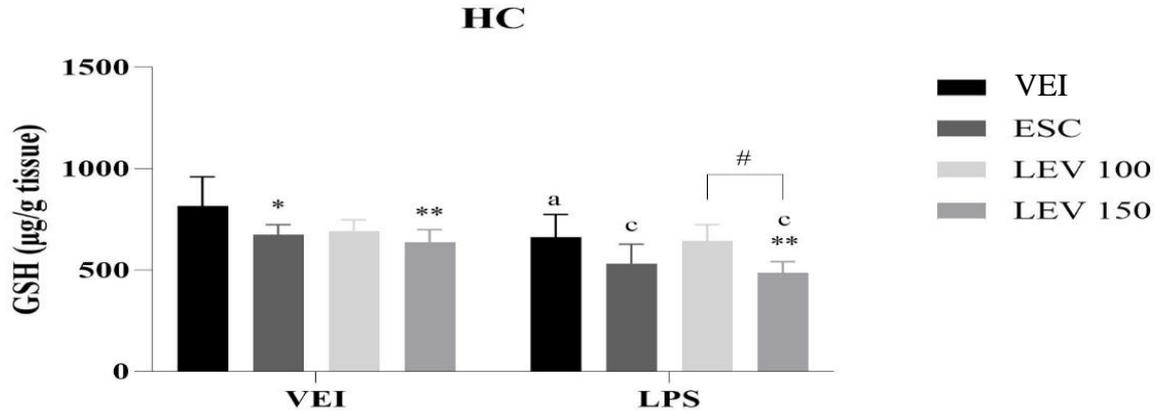
A análise do hipocampo mostrou que os grupos LPS+VEI, LPS+ESC e LPS+LEV150 apresentaram níveis reduzidos de GSH comparados aos seus respectivos controles (VEI+VEI, VEI+ESC e VEI+LEV150, p<0,001, p<0,05 e p<0,05, respectivamente) e o grupo LPS+LEV150 em relação ao LPS+VEI (p<0,01). Além disso, pode ser visto na Figura 16A que a ESC e a LEV150 isoladamente reduziram os níveis de GSH do hipocampo, comparando-se ao controle VEI+VEI (p<0,001 e p<0,01 respectivamente) [F (3, 56) = 1,362, p=0,2638]

No corpo estriado também foi observada redução de GSH com a administração do LPS em relação ao controle sadio (LPS+VEI x VEI+VEI = p<0,05). Redução esta que também ocorreu no grupo VEI+ESC em relação ao VEI+VEI (p<0,01) [F (3, 56) = 2,569, p=0,0634], como mostrado através da Figura 16B.

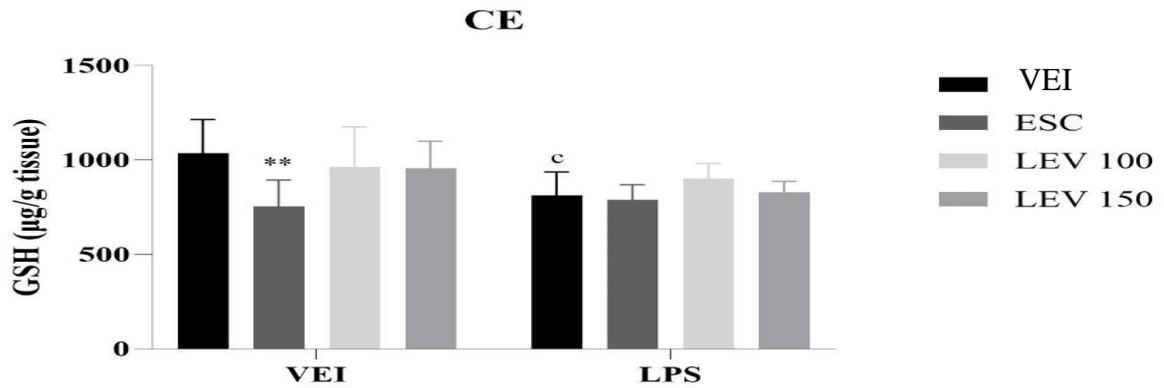
Por fim, no CPF (FIGURA 16C) também foi observada redução significativa dos níveis de GSH nos grupos: LPS+VEI em relação ao controle VEI+VEI (p<0,001), LPS+ ESC em relação ao seu controle VEI+ESC (p<0,001), e LPS+ LEV100 em relação ao seu controle VEI+LEV100 (p<0,01), havendo interação significativa entre os fatores [F (3, 56) = 4,104, p=0,0106].

Figura 16 - Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de GSH em camundongos

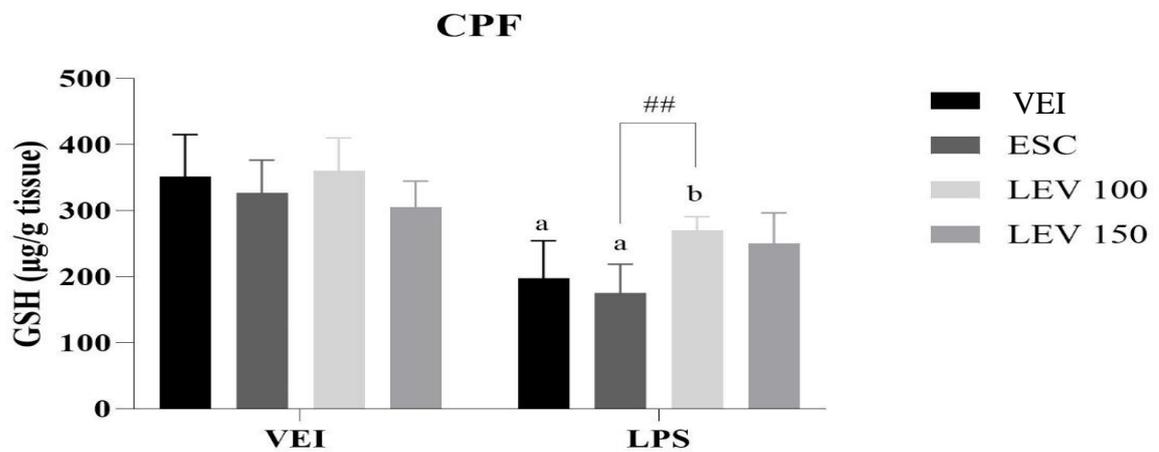
A.



B.



C.



Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs controle. # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  grupo vs grupo. As letras (c  $p < 0,05$ ; b  $p < 0,01$ ; a  $p < 0,001$ ) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

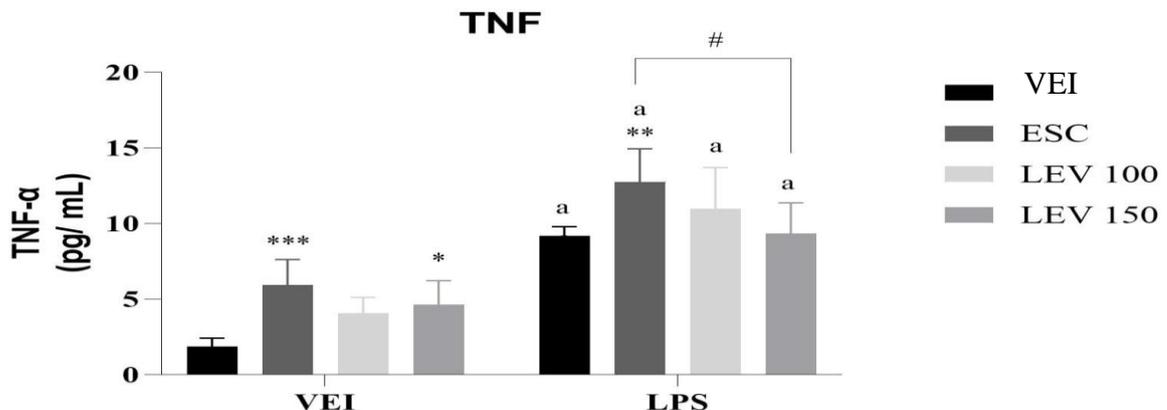
#### 5.2.4 Efeito da administração de ESC e LEV sobre a concentração de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ em soro de camundongos

O LPS induziu aumento na expressão de TNF- $\alpha$  em relação aos controles ( $p < 0,001$ ): LPS+VEI x VEI+VEI; LPS+ESC x VEI+ESC; LPS+LEV100 x VEI+LEV100 e LPS+LEV150 x VEI+LEV150. Aumento este que também foi significativo nos grupos VEI+ESC ( $p < 0,001$ ) e VEI+LEV150 ( $p < 0,05$ ) em relação ao VEI+VEI e no grupo LPS+ESC ( $p < 0,01$ ) comparando-se ao LPS+VEI, como visto na Figura 17A [F (3, 56) = 1,859,  $p = 0,1470$ ].

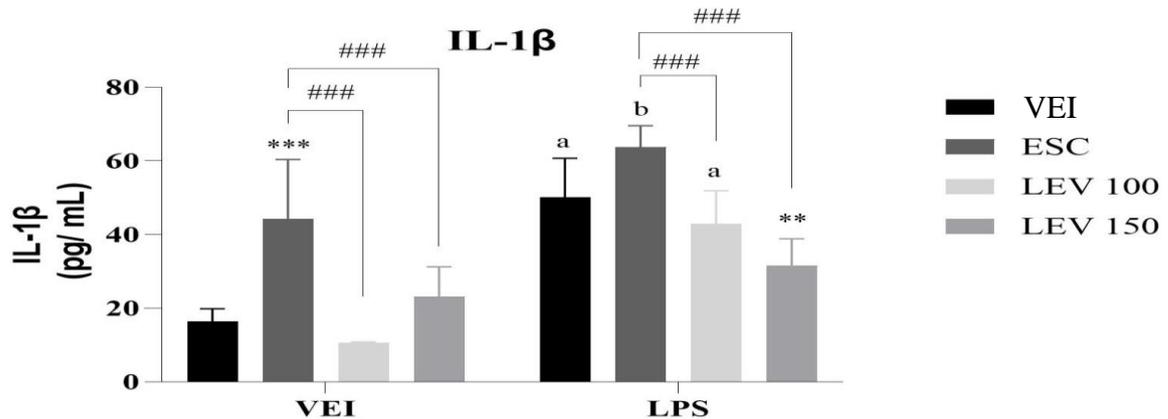
Da mesma forma, ocorreu aumento de IL-1 $\beta$  nos grupos LPS: LPS+VEI x VEI+VEI ( $p < 0,001$ ); LPS+ESC x VEI+ESC ( $p < 0,01$ ); LPS+LEV100 x VEI+LEV100 ( $p < 0,001$ ). Bem como aumentou no grupo VEI+ESC em relação ao VEI+VEI ( $p < 0,001$ ), como visto na Figura 17B [F (3, 56) = 7,427,  $p = 0,0003$ ].

Figura 17 - Efeito da administração de ESC e LEV sobre a concentração de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em hipocampo de camundongos

A.



B.

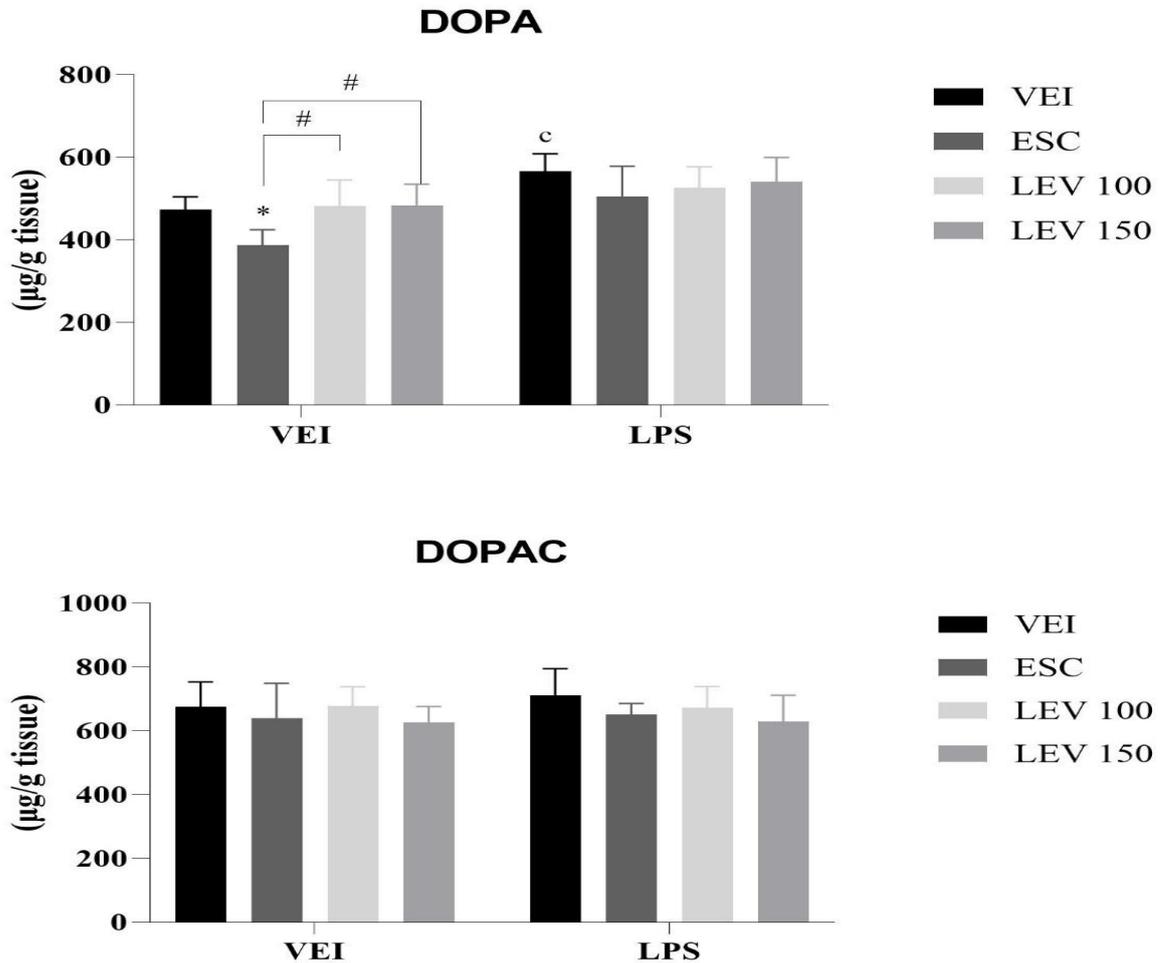


Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$  vs controle. # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  grupo vs grupo. As letras (c  $p < 0,05$ ; b  $p < 0,01$ ; a  $p < 0,001$ ) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

### 5.2.5 Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de DOPA e DOPAC em hipocampo de camundongos.

A análise dos níveis de DOPA por two-way ANOVA no hipocampo demonstrou que o grupo LPS+VEI apresentou aumento de DOPA comparado ao controle VEI+VEI ( $p < 0,05$ ). Além disso, pode-se observar que a escopolamina, *per si*, reduziu a concentração de DOPA em relação ao grupo que recebeu somente veículo ( $p < 0,05$ ) [F (3, 56) = 1.584,  $p = 0,2033$ ]. Por outro lado, não foi observada diferença significativa nos níveis de DOPAC entre os grupos estudados [F (3, 56) = 0.2250,  $p = 0,8786$ ], conforme mostrado na Figura 18.

Figura 18 - Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de DOPA e DOPAC em hipocampo de camundongos.



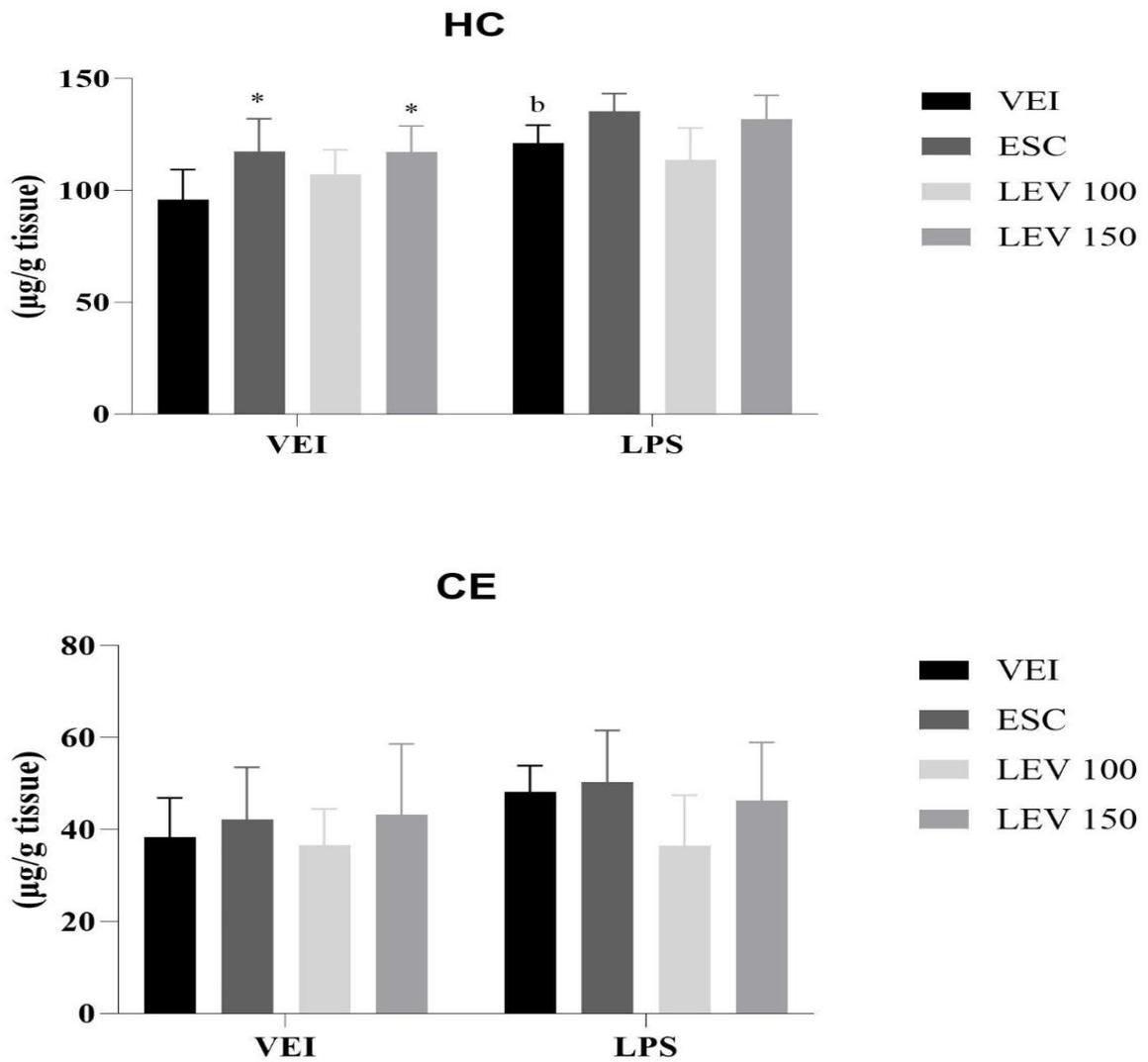
Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<,0001 vs controle. #p <0,05, ##p<0,01; ###p<0,001 grupo vs grupo. As letras (c p < 0,05; b p < 0,01; a p < 0,001) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

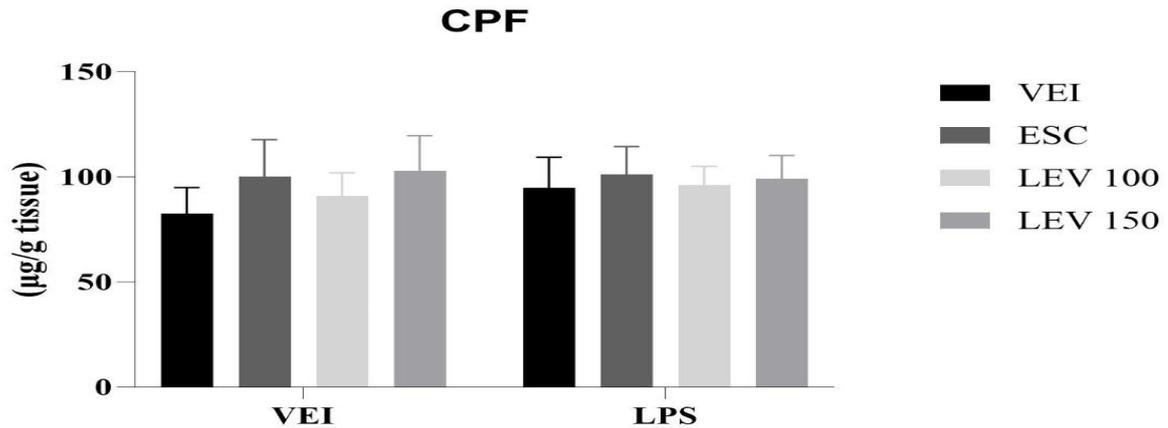
### 5.2.6 Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de glutamato em camundongos.

A análise dos níveis de glutamato por two-way ANOVA no hipocampo demonstrou aumento deste no grupo LPS+VEI comparado ao controle VEI+VEI (p<0,01). Além disso, também pode-se observar que nos grupos ESC+VEI e LEV150+VEI houve

aumento da concentração de glutamato em relação ao grupo VEI+VEI ( $p < 0,05$ ) [ $F(3, 56) = 5,662$ ,  $p = 0,0018$ ]. Por outro lado, não foi observada diferença significativa nos níveis de glutamato entre os grupos estudados no CE [ $F(3, 56) = 0,7189$ ,  $p = 0,5449$ ] e no CPF [ $F(3, 56) = 1,021$ ,  $p = 0,3902$ ], conforme mostrado na Figura 19.

Figura 19 - Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de glutamato em camundongos.





Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<,0001 vs controle. #p <0,05, ##p<0,01; ###p<0,001 grupo vs grupo. As letras (c p < 0,05; b p < 0,01; a p < 0,001) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

### 5.2.7 Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de GABA em camundongos.

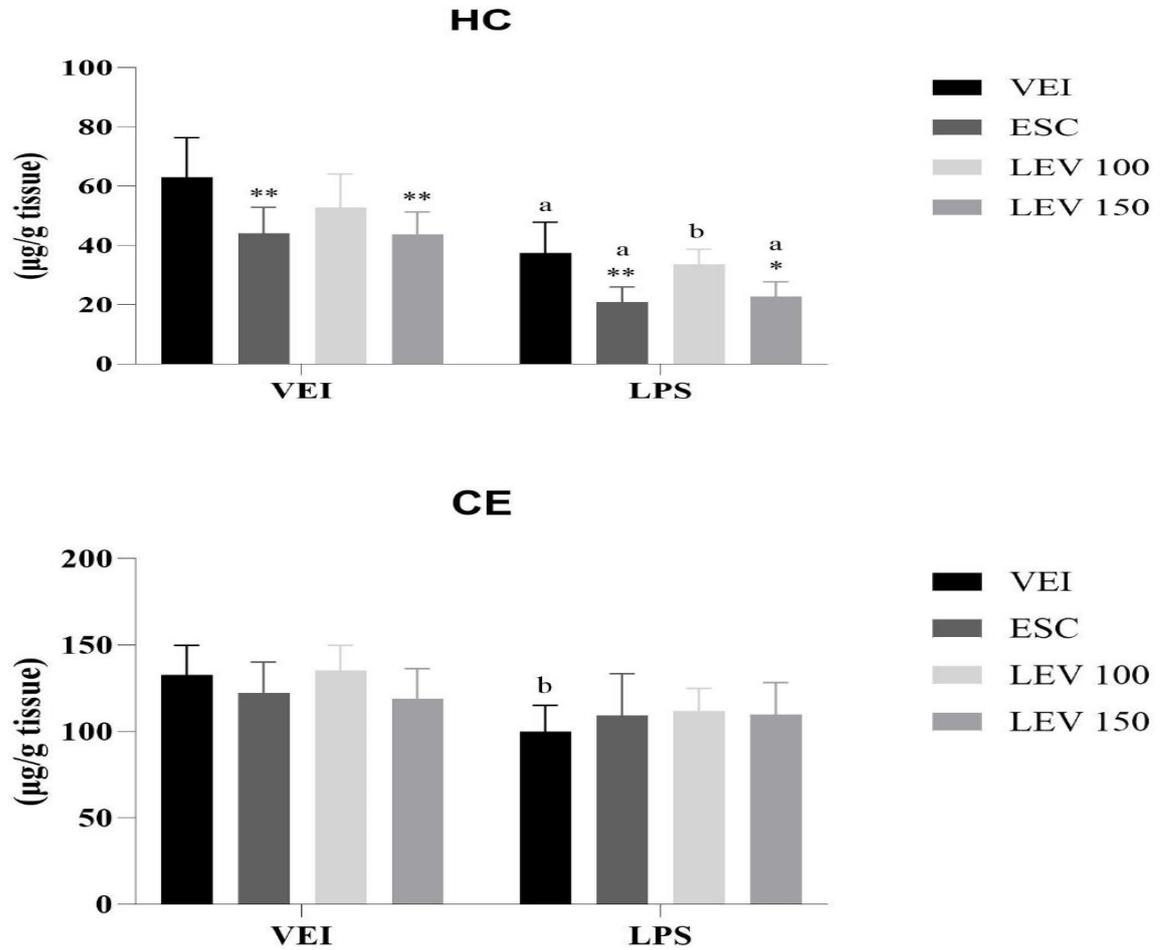
Conforme mostrado na Figura 20, a análise dos níveis de GABA por two-way ANOVA no hipocampo demonstrou redução deste nos grupos LPS+VEI (p<0,001), LPS+ESC (p<0,001), LPS+LEV100 (p<0,01) e LPS+LEV150 (p<0,001) comparados aos seus respectivos controles (VEI+VEI, VEI+ESC, VEI+LEV100 e VEI+LEV150). Além disso, pode-se observar que também houve redução da concentração de GABA nos grupos ESC+VEI e LEV150+VEI em relação ao grupo VEI+VEI (p<0,001) e dos grupos LPS+ESC (p<0,01) e LPS+LEV150 (p<0,05) em relação ao grupo LPS+VEI [F (3, 56) = 0.3929, p =0,7586].

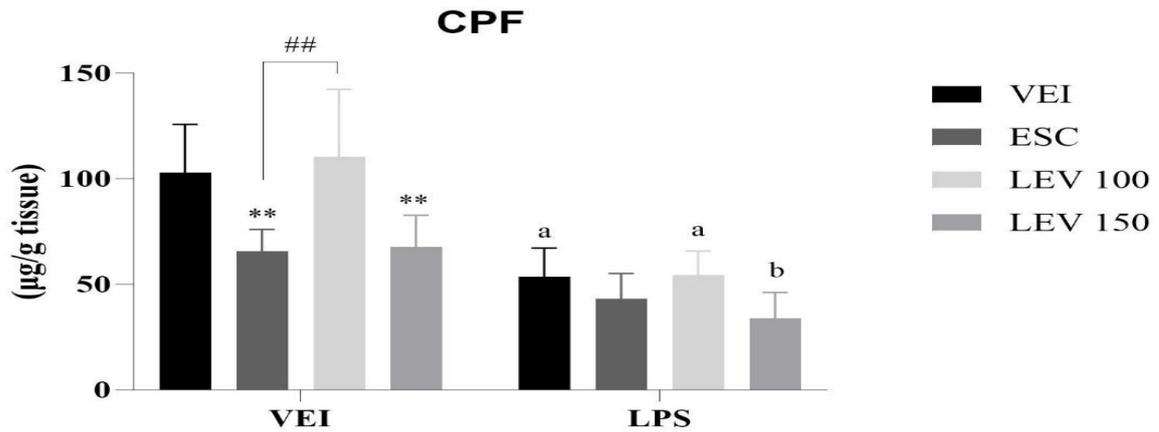
O corpo estriado também apresentou redução da concentração de GABA no grupo LPS+VEI em relação ao VEI+VEI (p<0,01) [F (3, 56) = 1.476, p =0,2309].

Por fim, a análise dos níveis de GABA no CPF demonstrou uma interação significativa entre os fatores [F (3, 56) = 2.972, p =0,0394], com redução de GABA nos grupos LPS+VEI (p<0,001), LPS+LEV100 (p<0,01) e LPS+LEV150 (p<0,01) comparados aos seus respectivos controles (VEI+VEI, VEI+LEV100 e VEI+LEV150). Além disso, pode-se observar que também houve redução da concentração de GABA nos grupos ESC+VEI e

LEV150+VEI em relação ao grupo VEI+VEI ( $p < 0,01$ ).

Figura 20 – Efeito da administração de ESC e LEV na determinação dos níveis de GABA em camundongos.





Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<,0001 vs controle. #p <0,05, ##p<0,01; ###p<0,001 grupo vs grupo. As letras (c p < 0,05; b p < 0,01; a p < 0,001) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

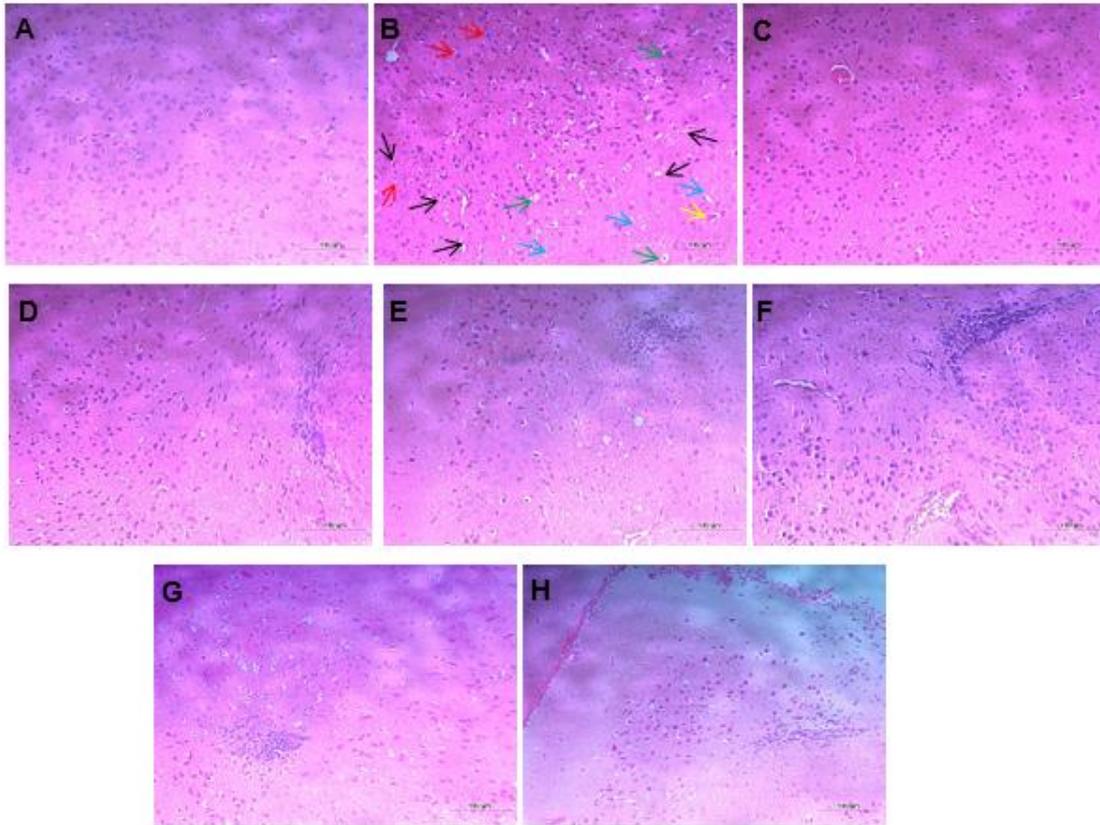
### 5.3 Avaliação Histopatológica

#### 5.3.1 Efeito da administração de ESC e LEV sobre as alterações histopatológicas no córtex pré-frontal de camundongos

A coloração de segmentos cerebrais com hematoxilina e eosina propiciou visualizar microscopicamente a arquitetura tecidual e analisar as alterações morfológicas induzidas por levofloxacina, escopolamina e lipopolissacarídeo.

Em condições normais, conforme demonstrado neste estudo pelo grupo veículo, o córtex pré-frontal encontra-se preservado, isto é, sem alterações morfológicas, como visto na Figura 21 e na Tabela 3. Enquanto a administração de LPS induziu alterações como: retração do corpo neuronal, congestão vascular, edema, vacuolização e núcleo picnótico, quando comparado ao grupo controle. Observam-se alterações semelhantes no grupo que recebeu ESC 1,5 mg/kg quando comparado ao LPS. No tratamento com LEV nas doses de 100 e 150 mg/kg também foram observadas alterações morfológicas quando comparados ao grupo salina. No entanto, menos intensas quando comparados ao grupo LPS.

Figura 21 – Fotomicrografias do córtex pré-frontal de camundongos tratados com levofloxacina. Magnificação de 200x, coloração: hematoxilina e eosina. (A) Grupo controle, (B) Grupo LPS, (C) Grupo ESC, (D) Grupo LEV 100 mg/Kg, (E) Grupo LEV 150 mg/Kg, (F) Grupo ESC + LPS, (G) Grupo LEV 100 mg/Kg + LPS, (H) Grupo LEV 150 mg/Kg + LPS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda:

- Retração do corpo neuronal
- Congestão vascular
- Edema
- Vacuolização
- Núcleo picnótico

Tabela 3: Os resultados são expressos como: mediana, mínimo e máximo mostrados nos parênteses. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal– Wallis.

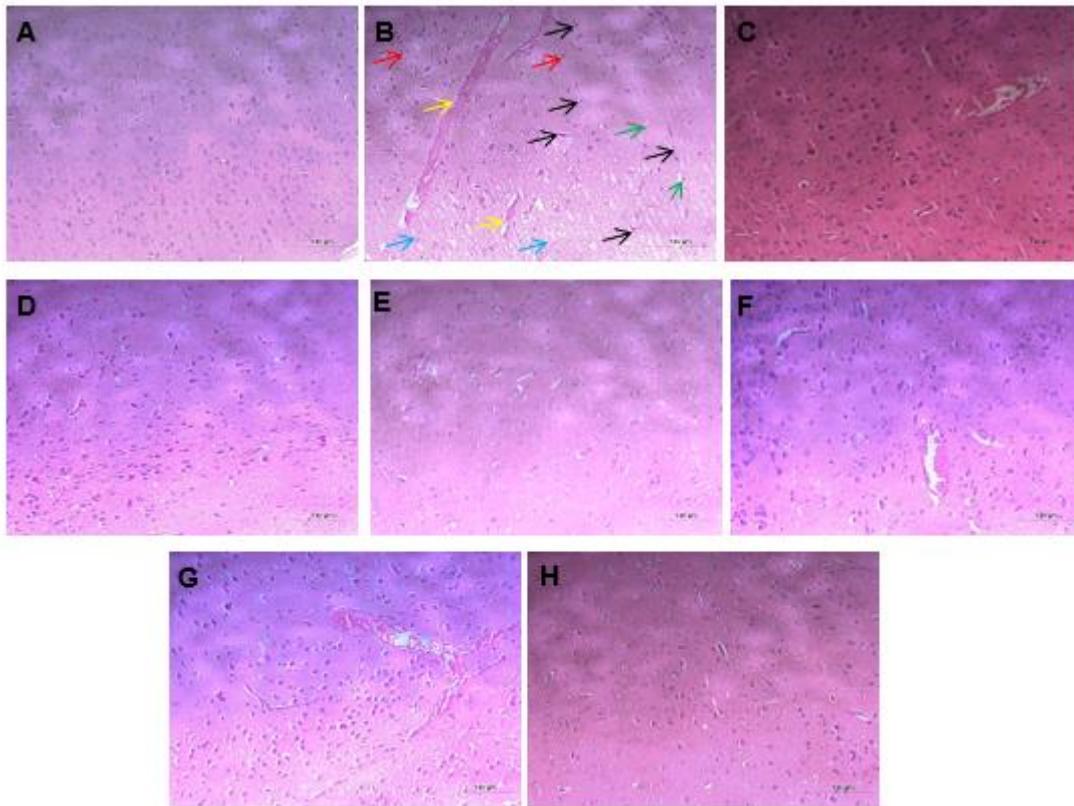
GRUPOS EXPERIMENTAIS	ESCORES MICROSCÓPICOS (0 – 3)
SALINA	0 (0 - 1)
LPS	2 (0 - 3)
ESC	2 (0 - 3)
LEVO 100	1 (0 - 1)
LEVO 150	1 (0 - 2)
ESC + LPS	3 (1- 3)
LEVO 100 + LPS	2 (0 - 3)
LEVO 150 + LPS	1 (1 - 2)

**Fonte: Elaborada pelo autor.**

### *5.3.2 Efeito da administração de ESC e LEV sobre as alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos*

A Figura 22 e a Tabela 4 ilustram o resultado da avaliação microscópica, evidenciando um processo inflamatório no grupo LPS, com a presença de edema, vacuolização, núcleo picnótico, retração do corpo neuronal e congestão vascular quando comparado ao grupo veículo com aspecto natural preservado. Nos grupos que receberam tratamento com ESC e LEV 100 mg/kg observam-se alterações semelhantes ao grupo LPS. Enquanto no grupo que recebeu LEV 150 mg/kg, observa-se alterações quando comparado ao grupo veículo, mas com menos intensidade quando comparado aos demais grupos. Nos grupos que receberam ESC e LEV 150 mg/kg associados com LPS não foi observado um aumento da intensidade das alterações morfológicas quando comparados com os respectivos grupos sem LPS. No entanto, no grupo LEV 100 + LPS houve um aumento quando ao grupo LEV 100.

Figura 22 – Fotomicrografias do corpo estriado de camundongos tratados com levofloxacina. Magnificação de 200x, coloração: hematoxilina e eosina. (A) Grupo controle, (B) Grupo LPS, (C) Grupo ESC, (D) Grupo LEV 100 mg/Kg, (E) Grupo LEV 150 mg/Kg, (F) Grupo ESC + LPS, (G) Grupo LEV 100 mg/Kg + LPS, (H) Grupo LEV 150 mg/Kg + LPS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda:

- Retração do corpo neuronal
- Congestão vascular
- Edema
- Vacuolização
- Núcleo picnótico

Tabela 4: Os resultados são expressos como: mediana, mínimo e máximo mostrados nos parênteses. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal– Wallis.

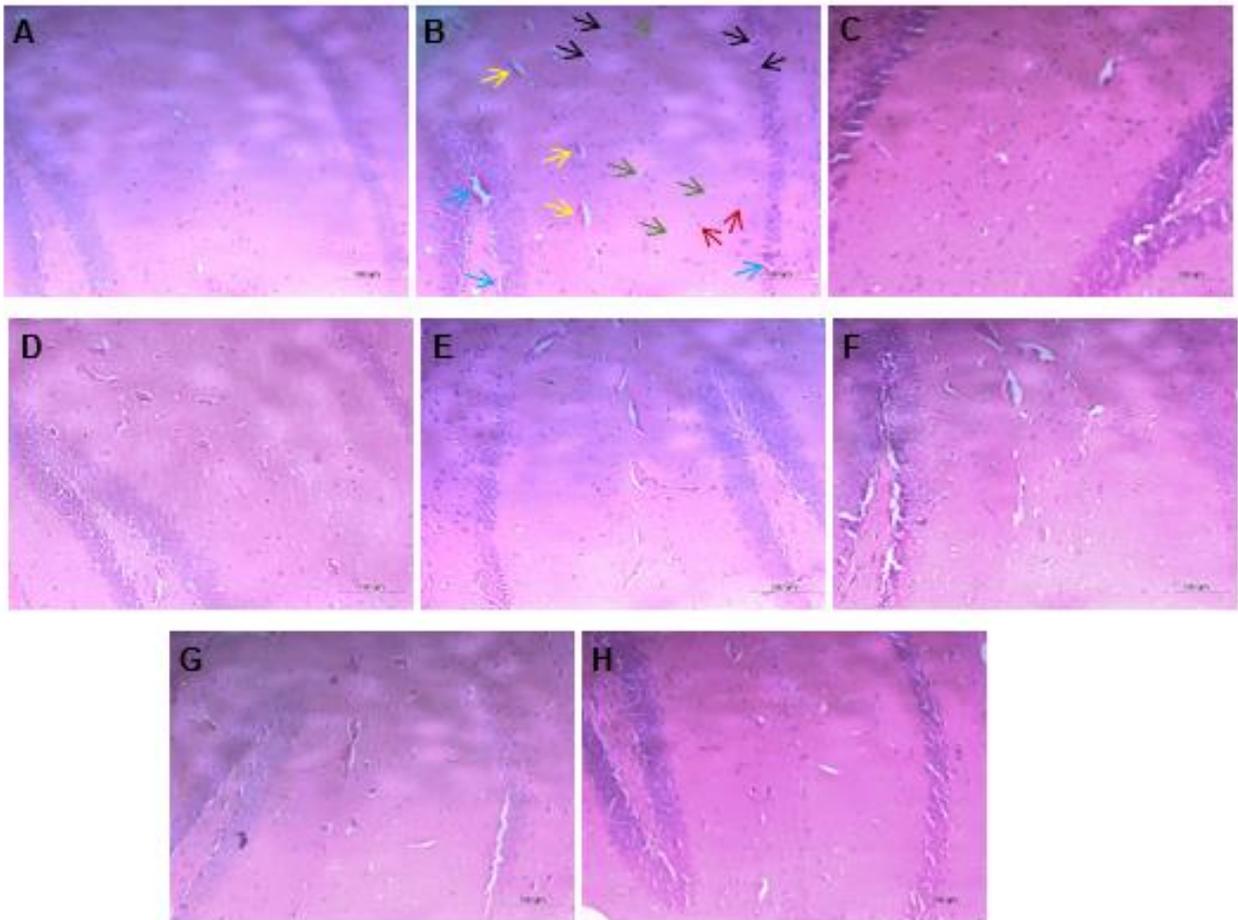
<b>GRUPOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>ESCORES MICROSCÓPICOS (0 – 3)</b>
SALINA	0 (0 - 1)
LPS	2 (0 - 3)
ESC	2 (0 - 2)
LEVO 100	2 (0 - 2)
LEVO 150	1 (0 - 2)
ESC + LPS	2 (0- 3)
LEVO 100 + LPS	3 (0 - 3)
LEVO 150 + LPS	1 (0 - 2)

**Fonte: Elaborada pelo autor.**

### *5.3.3 Efeito da administração de ESC e LEV sobre as alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos*

A Figura 23 e a Tabela 5 ilustram o resultado da avaliação microscópica, evidenciando um processo inflamatório no grupo LPS, com a presença de edema, vacuolização, núcleo picnótico, retração do corpo neuronal e congestão vascular quando comparado ao grupo veículo com aspecto natural preservado. Nos grupos que receberam tratamento com ESC e LEV 100 e 150 mg/kg observam-se alterações semelhantes ao grupo LPS. Nos grupos tratados com ESC e LEV 100 e 150 mg/kg associados com LPS também apresentam alterações morfológicas comparados ao grupo veículo.

Figura 23 – Fotomicrografias do hipocampo de camundongos tratados com levofloxacina. Magnificação de 200x, coloração: hematoxilina e eosina. (A) Grupo controle, (B) Grupo LPS, (C) Grupo ESC, (D) Grupo LEV 100 mg/Kg, (E) Grupo LEV 150 mg/Kg, (F) Grupo ESC + LPS, (G) Grupo LEV 100 mg/Kg + LPS, (H) Grupo LEV 150 mg/Kg + LPS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda:

- Retração do corpo neuronal
- Congestão vascular
- Edema
- Vacuolização
- Núcleo picnótico

Tabela 5: Os resultados são expressos como: mediana, mínimo e máximo mostrados nos parênteses. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal– Wallis.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	ESCORES MICROSCÓPICOS (0 – 3)
SALINA	0 (0 - 1)
LPS	1 (0 - 3)
ESC	1 (0 - 3)
LEVO 100	1 (0 - 2)
LEVO 150	1 (0 - 3)
ESC + LPS	2 (0- 3)
LEVO 100 + LPS	1 (0 - 2)
LEVO 150 + LPS	1 (0 - 2)

**Fonte: Elaborada pelo autor.**

## 5.4 Avaliação Imunohistoquímica

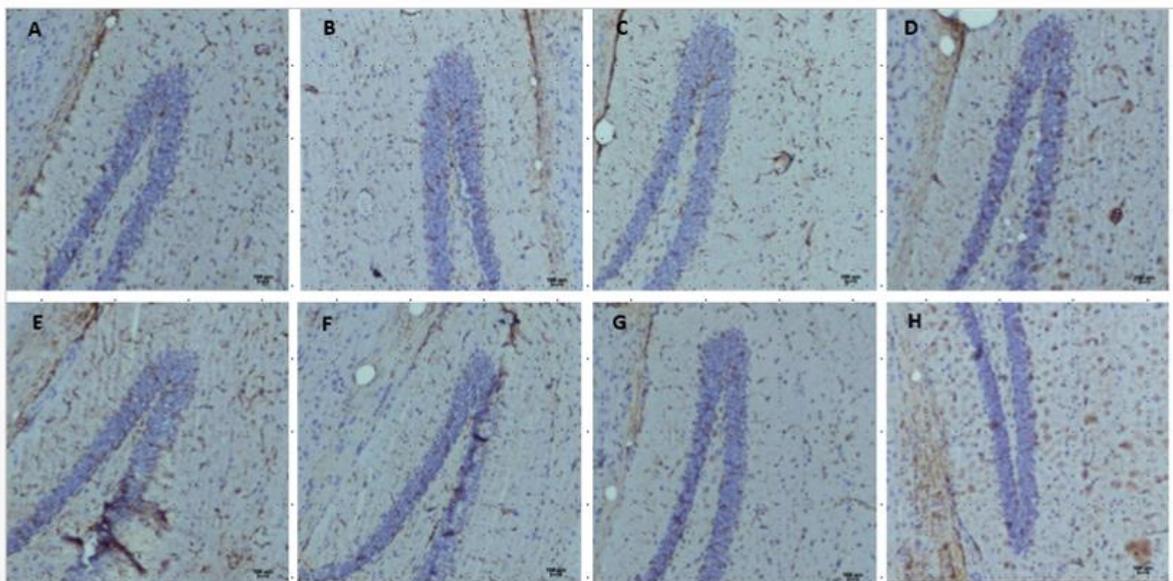
### *5.4.1 Efeitos da submissão à ESC e à LEV na imunomarcção para expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em diferentes áreas do hipocampo*

Após ser realizada a técnica de imunohistoquímica para avaliar a expressão de GFAP nas diferentes áreas do hipocampo, como CA3, CA1 e giro denteado (GD), foram observados resultados significativos no GD de aumento da densidade óptica no giro denteado dos animais sadios tratados com escopolamina quando comparados aos animais controle, ademais, os valores obtidos para escopolamina (ESC) se mostraram também muito maiores que os de levofloxacina 100 e 150 (LEV 100, LEV 150), como também atestou-se uma menor densidade óptica nos grupos doentes tratados com LEV 100 e LEV 150 em comparação ao controle doente. Já no CA1 observa-se a manutenção do grande aumento de densidade óptica dos animais sadios tratados com ESC, além de uma manutenção da redução da densidade

óptica no grupo dos doentes tratados com LEV 150. No CA3 foram analisados os resultados e confirmamos ainda nesta área do hipocampo o aumento na densidade óptica para GFAP dos animais sadios tratados com escopolamina, além do significativo aumento já esperado dos animais controle doente em comparação aos animais controle sadios que foi também observado nas outras áreas cerebrais previamente descritas.

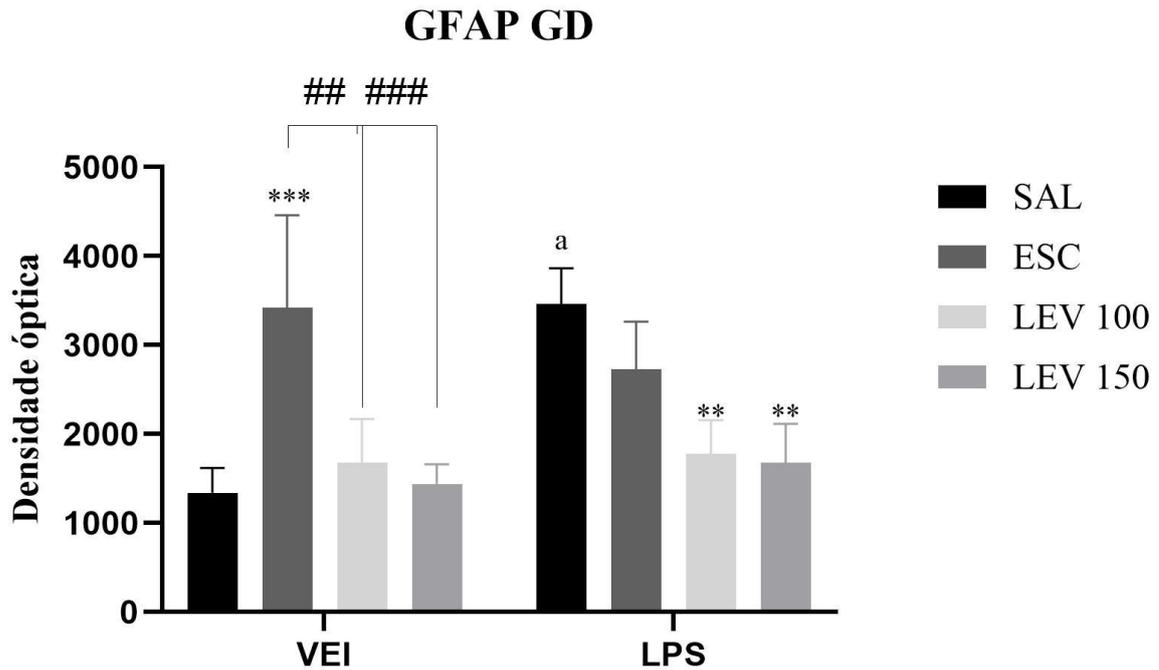
Figura 24 – Efeito da administração de ESC e LEV sobre a expressão de GFAP no Giro Denteado em hipocampo de camundongos.

GFAP – GD (x200)



**A** – Veículo  
**B** – ESC  
**C** – LEV 100  
**D** – Lev 150

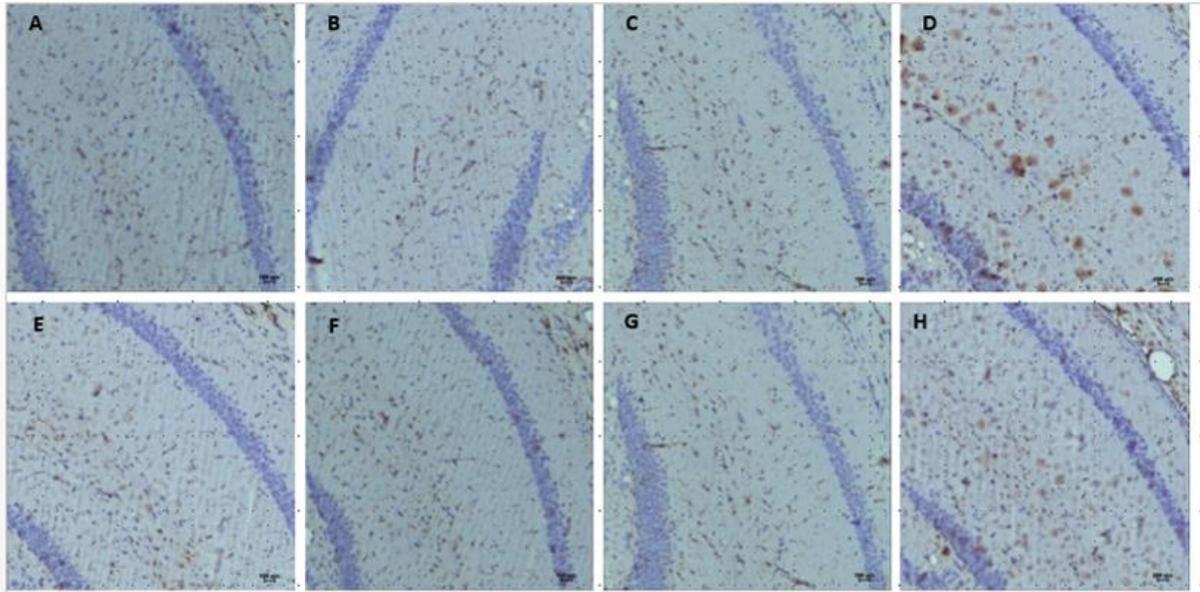
**E** – LPS  
**F** – LPS + ESC  
**G** – LPS + LEV 100  
**H** – LPS + Lev 150



Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<,0001 vs controle. #p <0,05, ##p<0,01; ###p<0,001 grupo vs grupo. As letras (c p < 0,05; b p < 0,01; a p < 0,001) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEH: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

Figura 25 – Efeito da administração de ESC e LEV sobre a expressão de GFAP no CA em CA1 em hipocampo de camundongos.

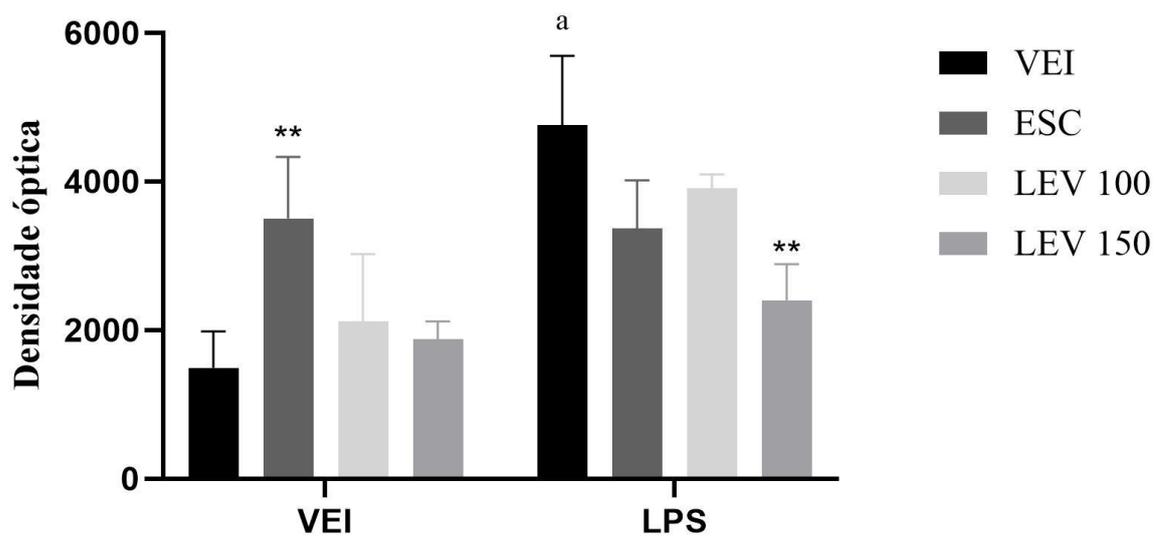
## GFAP – CA1 (x200)



**A** – Veículo  
**B** – ESC  
**C** – LEV 100  
**D** – Lev 150

**E** – LPS  
**F** – LPS + ESC  
**G** – LPS + LEV 100  
**H** – LPS + Lev 150

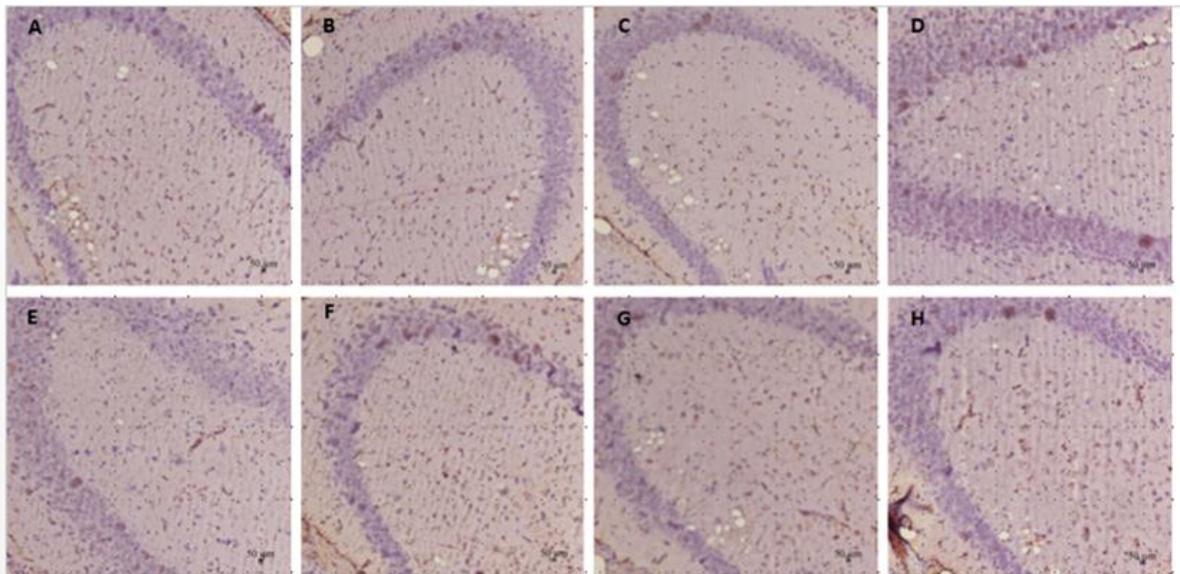
## GFAP CA1



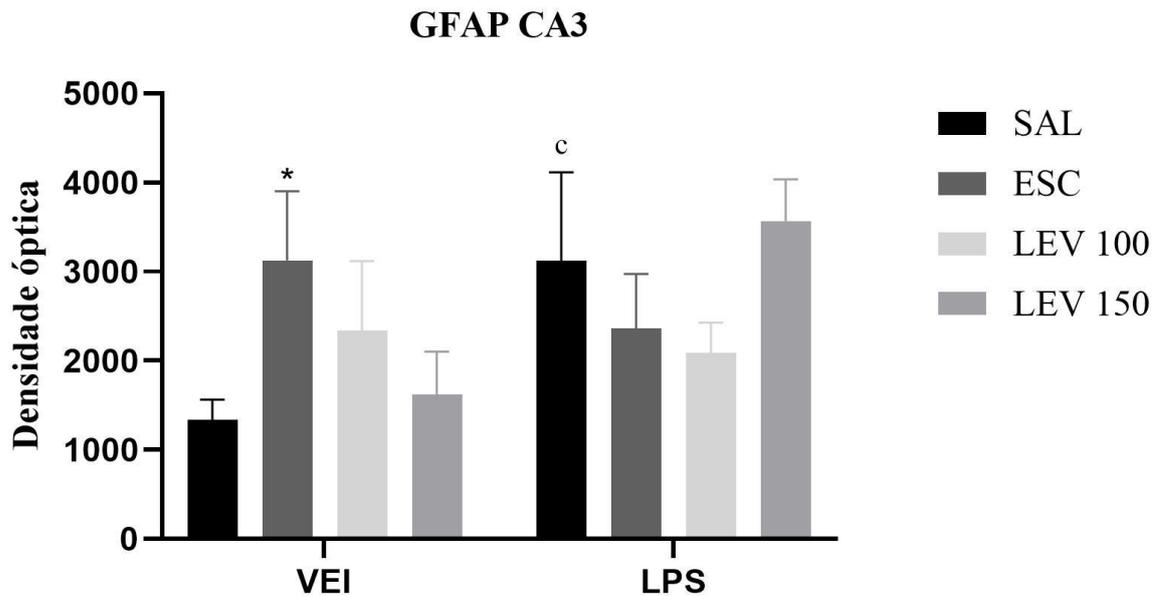
Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<,0001 vs controle. #p <0,05, ##p<0,01; ###p<0,001 grupo vs grupo. As letras (c p < 0,05; b p < 0,01; a p < 0,001) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

Figura 26 – Efeito da administração de ESC e LEV sobre a expressão de GFAP no CA3 em hipocampo de camundongos.

#### GFAP – CA3 (x200)



- |                    |                          |
|--------------------|--------------------------|
| <b>A</b> – Veículo | <b>E</b> – LPS           |
| <b>B</b> – ESC     | <b>F</b> – LPS + ESC     |
| <b>C</b> – LEV 100 | <b>G</b> – LPS + LEV 100 |
| <b>D</b> – Lev 150 | <b>H</b> – LPS + Lev 150 |



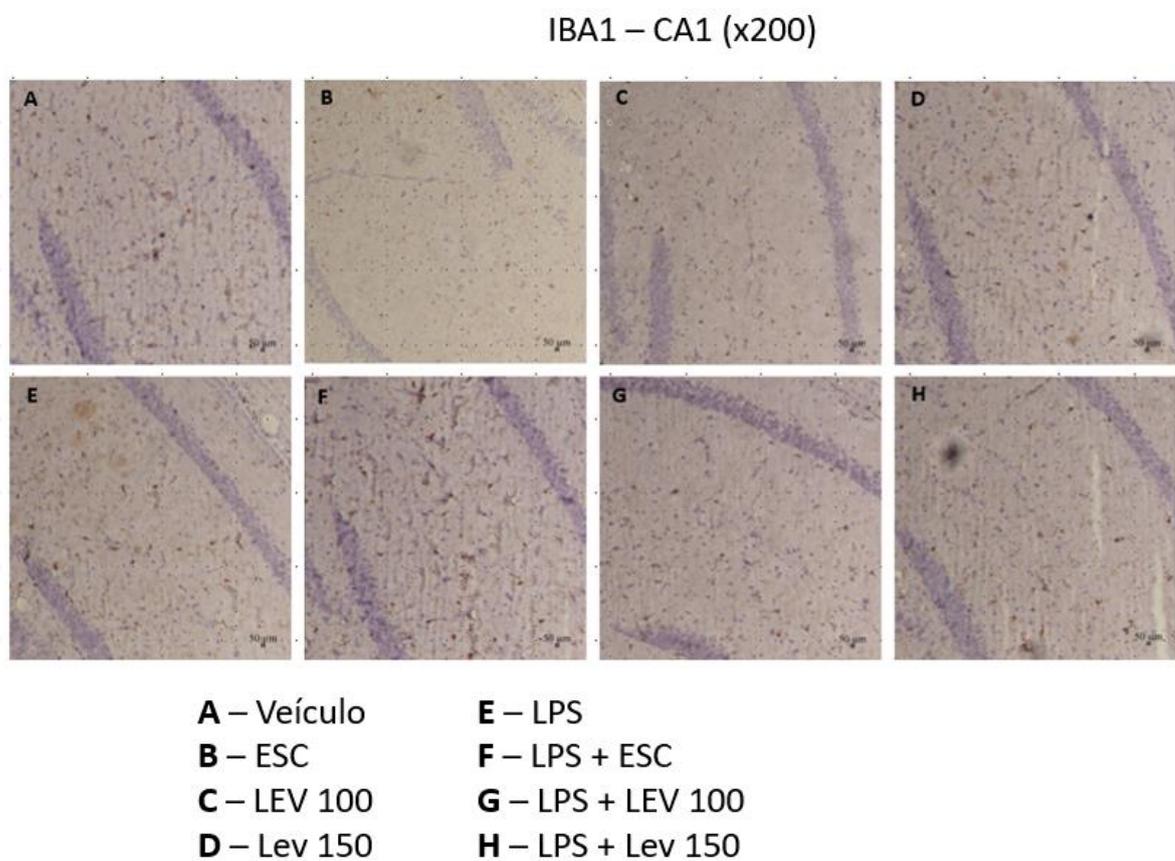
Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$  vs controle. # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  grupo vs grupo. As letras (c  $p < 0,05$ ; b  $p < 0,01$ ; a  $p < 0,001$ ) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

#### ***5.4.2 Efeitos da submissão à ESC e à LEV na imunomarcção para expressão da molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1 (IBA-1) em diferentes áreas do hipocampo***

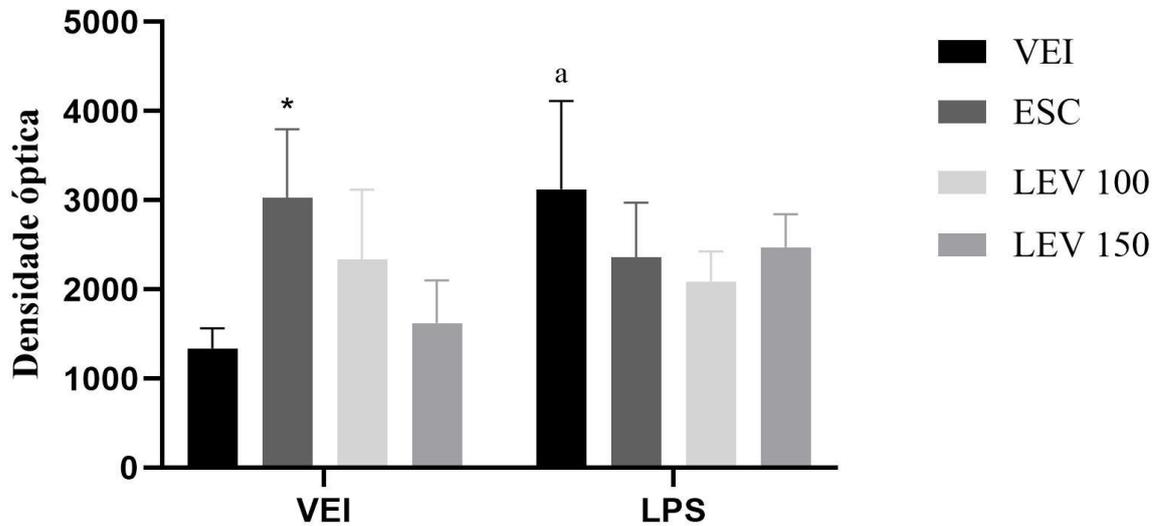
Após o ensaio de imunohistoquímica realizado para avaliar a expressão de IBA-1 em diferentes áreas do hipocampo, como CA1, CA3 e giro dentado (GD), de camundongos foram analisados os resultados. No CA1 observamos um aumento da densidade óptica (DO) nos animais sadios tratados com escopolamina, resultado semelhante ao descrito para expressão de GFAP, além do resultado já esperado de aumento da densidade óptica no controle doente para o controle sadio, que se manteve em todas as áreas analisadas. Já no CA3 foi atestada a manutenção do aumento do parâmetro de DO nos animais sadios tratados com ESC e também um aumento significativo no grupo de animais doentes tratados com LEV 100 em comparação ao controle doente. No giro dentado (GD) foi visto um nível menor de densidade óptica nos animais sadios tratados com LEV 150 quando comparados aos animais sadios tratados com ESC, além de um resultado interessante nos animais doentes, que não

apresentaram o aumento significativo do controle doente em relação ao controle sadio, mas apresentaram um significativo aumento de densidade óptica nos animais tratados com LEV 150 quando comparados ao seu controle, e nestes últimos foi observado um aumento também em relação ao LEV 100.

Figura 27 – Efeito da administração de ESC e LEV sobre a expressão de IBA1 no CA1 em hipocampo de camundongos.



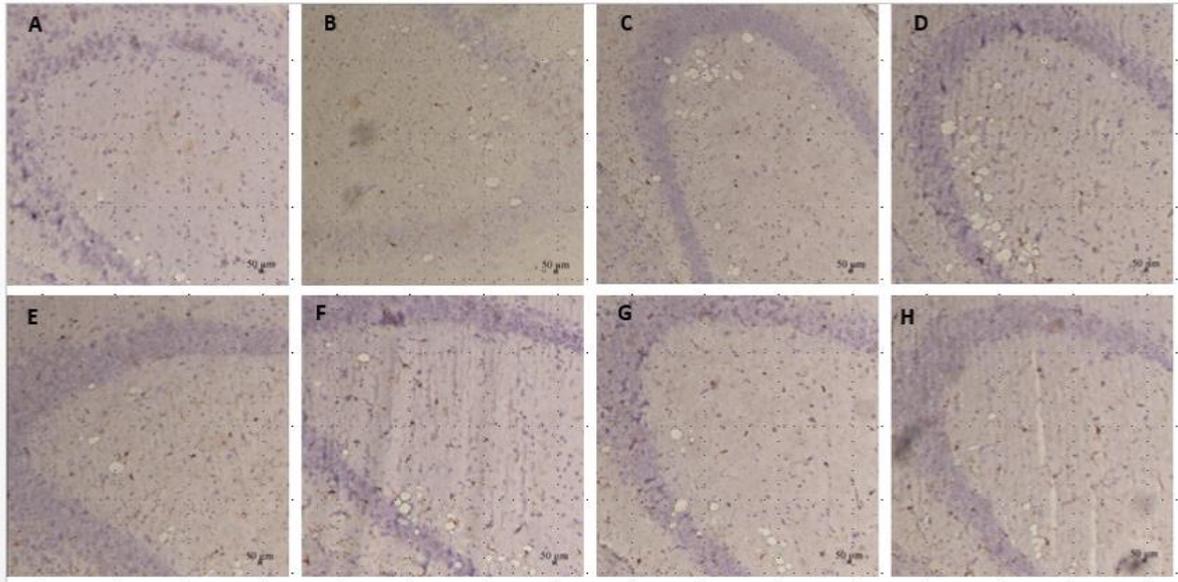
## IBA1 CA1



Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$  vs controle. # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  grupo vs grupo. As letras (c  $p < 0,05$ ; b  $p < 0,01$ ; a  $p < 0,001$ ) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

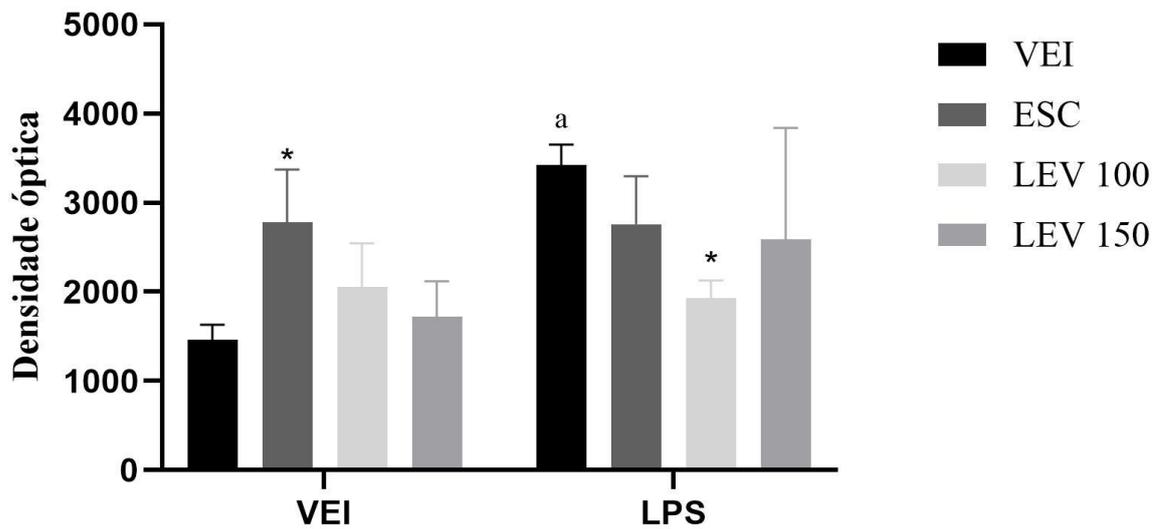
Figura 28 – Efeito da administração de ESC e LEV sobre a expressão de IBA1 no CA3 em hipocampo de camundongos.

## IBA1 – CA3 (x200)



- |                    |                          |
|--------------------|--------------------------|
| <b>A</b> – Veículo | <b>E</b> – LPS           |
| <b>B</b> – ESC     | <b>F</b> – LPS + ESC     |
| <b>C</b> – LEV 100 | <b>G</b> – LPS + LEV 100 |
| <b>D</b> – LEV 150 | <b>H</b> – LPS + LEV 150 |

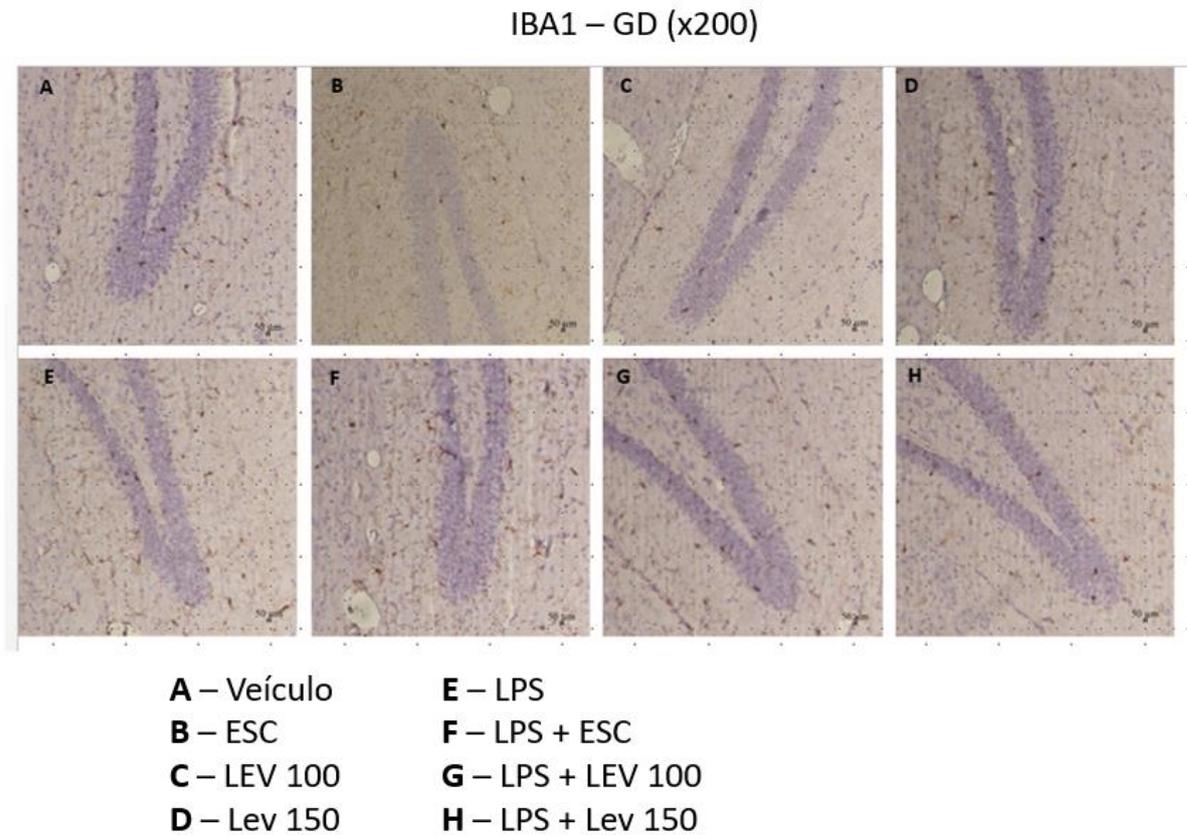
## IBA1 CA3

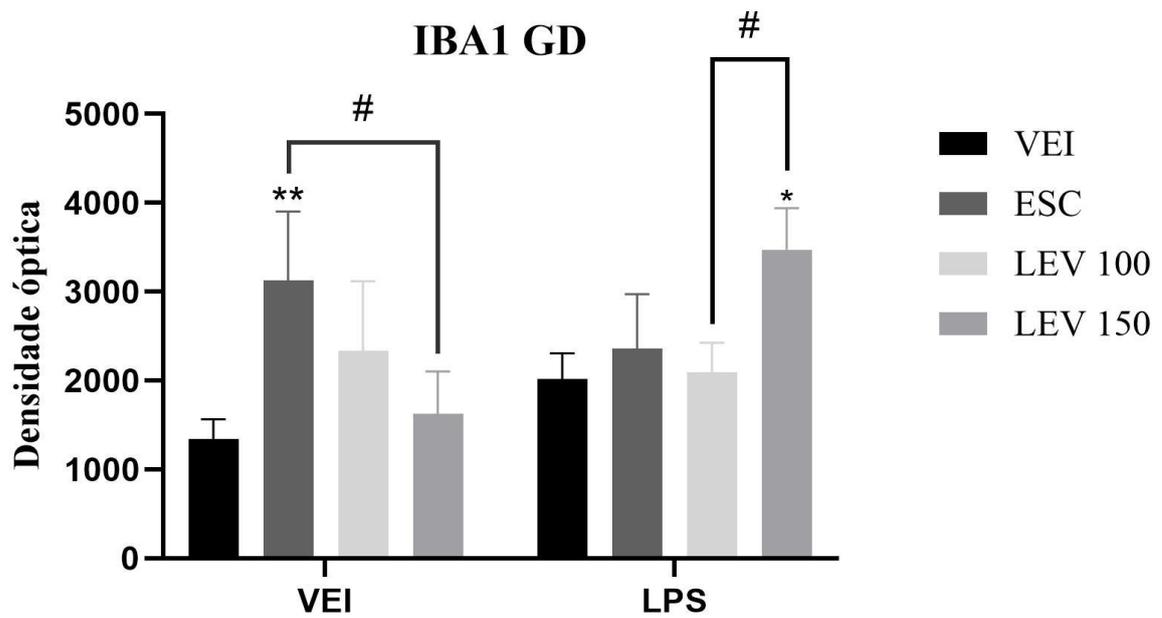


Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<,0001 vs

controle. #p <0,05, ##p<0,01; ###p<0,001 grupo vs grupo. As letras (c p < 0,05; b p < 0,01; a p < 0,001) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

Figura 29 – Efeito da administração de ESC e LEV sobre a expressão de IBA1 no Giro Denteado em hipocampo de camundongos.





Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<,0001 vs controle. #p <0,05, ##p<0,01; ###p<0,001 grupo vs grupo. As letras (c p < 0,05; b p < 0,01; a p < 0,001) são utilizadas quando comparar o grupo que recebeu LPS ao grupo respectivo grupo veículo (que não recebeu LPS); Abreviações: VEI: veículo, LEV100: levofloxacina 100mg/kg, LEV150: levofloxacina 150mg/kg, ESC: Escopolamina, LPS: Lipopolissacarídeo.

## 6 DISCUSSÃO

O *delirium* é uma síndrome neuropsiquiátrica transitória e de curso flutuante, com início agudo, caracterizada por disfunção cognitiva generalizada, alteração do estado de consciência e déficit de atenção (PRAYCE, 2018). Qualquer insulto agudo que perturbe a homeostase do sistema nervoso central (SNC) pode ser um fator precipitante para desencadear um episódio de *delirium* (SARAIVA; CEREJEIRA, 2014). A etiologia dessa condição é geralmente multifatorial (HARRISON *et al.*, 2017) e depende da interação entre a vulnerabilidade do paciente ao desenvolvimento de *delirium* (fatores predisponentes, substrato neurológico) e a gravidade dos fatores desencadeantes (HAN; SUYAMA, 2018). A principal hipótese para o desenvolvimento de *delirium* continua focada no papel dos neurotransmissores, inflamação e estresse crônico (INOUE S.K., 2006). Entre os fatores desencadeantes, destacam-se os medicamentos, sendo o fator mais comum, implicado em até 40% dos casos (PRAYCE, 2018).

As quinolonas, por sua vez, são um grupo de antibióticos amplamente utilizado devido ao perfil antibacteriano e de segurança (MANDELL; TILLOTSON, 2002). O espectro antibacteriano das quinolonas aumenta com cada geração, sendo fluoroquinolonas de quarta geração que cobrem o espectro mais amplo, incluindo gram-negativos, gram-positivos, anaeróbios e até micobactérias (WALKER; WRIGHT, 1991; SOOD *et al.*; 2018). A estrutura molecular das quinolonas confere a sua potente atividade antibacteriana, mas também os seus efeitos secundários (RUBINSTEIN, 2001). Embora as quinolonas sejam comumente descritas como bem toleradas, a taxa de eventos adversos é de 9,2 por 10.000 prescrições (SHEHAB *et al.*, 2008).

No presente estudo, de forma pioneira, buscou-se avaliar o potencial da levofloxacina como um agente desencadeador (fator precipitante) único da síndrome tipo-*delirium* em modelo animal.

Com o escopo de avaliar as alterações comportamentais, tais como o estado de atenção, de consciência e de cognição dos animais experimentais, foram realizados os testes de campo aberto (TCA), do nado forçado (NF), do rota-rod e do labirinto em y (Y-Maze), em conformidade com os testes realizados em estudos anteriores para determinar comportamentos semelhantes ao *delirium* (PENG *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2022; REEN *et al.*, 2023).

Nos resultados comportamentais deste trabalho foi explicitado um aumento de atividade locomotora no grupo de animais sadios (veículo) tratados com escopolamina (ESC),

corroborando com outros achados na literatura (CHEON *et al.*, 2021; YUN *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2023). Enquanto no grupo tratado com levofloxacina na dose de 150 mg/kg (LEV 150) houve uma diminuição significativa na atividade locomotora em relação ao grupo tratado apenas com salina. Já no grupo de animais doentes [expostos ao lipopolissacarídeo na dose de 0,5 mg/kg (LPS)], foi observada uma redução da atividade locomotora em relação aos animais sadios, o que está em conformidade com o que se consta em literatura científica (FONKEN *et al.*, 2013; NORDEN *et al.*, 2016), com exceção da redução significativa da hipoatividade locomotora no grupo doente exposto à ESC. Os resultados obtidos trazem dados que reforçam o potencial locomotor hiperativo da escopolamina (VOLGIN *et al.*, 2019) característico do delírium hiperativo e excitado, além de explicitar de forma inovadora um potencial da levofloxacina na dose de 150 mg/kg causar uma locomoção hipoativa, sintoma característico do delírium hipoativo e catatônico, no modelo sadio utilizado. Ademais, houve um aumento de comportamento de autocuidado nos grupos doentes (LPS) expostos à ESC e à LEV 100 quando comparado aos animais doentes que não receberam essas substâncias.

O teste do labirinto em Y é o experimento mais realizado nos estudos pré-clínicos quando se deseja avaliar fatores como memória de curto prazo, cognição e noção espacial do animal estudado. No teste descrito em literatura é buscado avaliar características de exploração inatas do animal além de memória de trabalho frente ao labirinto com 3 caminhos. O principal parâmetro observado nesse teste é a alternância espontânea entre os braços que o animal se propõe a explorar, que exige uma conexão bem estabelecida de diferentes áreas cerebrais, como o hipocampo, córtex pré-frontal, corpo estriado, entre outras. Caso o roedor não apresente um número aceitável de alternâncias espontâneas entre os braços do labirinto pode-se pressupor que o animal possui comprometimento cognitivo gerado possivelmente pelo mal funcionamento hipocampo (HÖLTER *et al.*, 2015; KRAEUTER *et al.*, 2019). Em relação aos nossos grupos experimentais expostos ao labirinto em Y, a escopolamina e a levofloxacina na dose de 150 mg/kg (LEV 150) foram capazes de gerar dano cognitivo perceptivo no grupo de animais sadios (sem exposição ao LPS) quando comparado aos animais que não foram expostos a nenhuma substância (controle salina). Foi observado, também, em nosso estudo que a levofloxacina na dose de 150 mg/kg foi capaz de intensificar o dano cognitivo nos animais doentes (com exposição ao LPS).

O teste do nado forçado é um teste comportamental pré-clínico estabelecido para alguns modelos animais murinos, ratos e camundongos, para avaliar a ação de antidepressivos e drogas estimulantes a partir do tempo de imobilidade do animal quando submetido a uma situação súbita de estresse em um receptáculo cheio de água (COSTA *et al.*, 2013). Como o

teste também avalia o retardo psicomotor característico da depressão (UNAL; CANBEYLI, 2019), o experimento pode ser feito para avaliar outras condições em que os fatores locomoção e excitabilidade são medidas cruciais. Sendo assim, quanto maior o tempo de imobilidade do murino em situação pontual de perigo e estresse, sugere-se a falta de estímulo para sobrevivência ou até mesmo a falta de capacidade psicomotora de realizar a ação de lutar pela sua vida. Estudos anteriores, utilizando modelos de inflamação aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS), já demonstraram a capacidade em aumentar o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (ARIOZ *et al.*, 2019; LI W. *et al.*, 2021; LI Y. *et al.*, 2021; YIN R. *et al.*, 2023). A injeção intraperitoneal de LPS induz inflamação local e pode modular a ativação microglial do tronco cerebral, hipotálamo e estruturas límbicas através de aferentes vagais em resposta ao LPS administrado periféricamente, induzindo assim comportamentos semelhantes à depressão em cerca de 24 horas (YIN *et al.*, 2023). A escopolamina é um fármaco antagonista não seletivo do receptor muscarínico e tem produzido consistentemente comprometimento de aprendizagem de base emocional em roedores (POPOVIĆ *et al.*, 2015). Ela tem sido usada como medicamento de referência padrão para induzir déficits cognitivos relacionados à idade e à demência em humanos e animais saudáveis (Rahmati B., *et al.*, 2017). Com isso, quando os animais foram desafiados ao teste do nado forçado, o grupo tratado com escopolamina em nosso estudo obteve resultados que se mostraram condizentes com a literatura (NASEHI *et al.*, 2019) ao reduzir o tempo de imobilidade dos animais, tanto dos sadios quanto dos doentes (expostos ao LPS), o que é condizente com o efeito hiperativo locomotor e antidepressivo rápido da escopolamina.

As fluoroquinolonas, por sua vez, têm sido associadas a diversos efeitos adversos no sistema nervoso central, incluindo reações adversas psiquiátricas. Esses efeitos foram incluídos em suas bulas pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA. As reações adversas relatadas incluem agitação, tremores, crises epiléticas e alucinações (Baggio D. & ANANDA-RAJAH M.R., 2021). Um estudo mostrou que a levofloxacin nas doses de 10, 20 e 40mg/kg não foi capaz de alterar o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (Erden BF. *et al.*, 2001). No entanto, um outro estudo mostra que em doses maiores a levofloxacin é capaz de aumentar o tempo de imobilidade (Takasuna K. *et al.*, 1992), o que entra em contradição com os achados do trabalho em que a levofloxacin na dose de 100 mg/kg e de 150 mg/kg foi capaz de diminuir significativamente o tempo de imobilidade nos animais doentes (tratados com LPS). Isto torna ainda mais curioso o resultado obtido no presente estudo, pois pode-se sugerir em um possível mecanismo da levofloxacin de proteção contra alguns dos danos causados pelo LPS (danos psicomotores), levando a um

quadro mais hiperativo, semelhante ao da escopolamina, em uma situação tipo-doença quando colocado em um quadro de estresse súbito (nado forçado). Contudo, vale ressaltar que quando foram avaliados os experimentos realizados no labirinto em Y, constatou-se uma espécie de efeito sinérgico com o LPS para danos cognitivos relacionados à memória de curto prazo. Mostra-se dessa maneira que a levofloxacina pode ser capaz de proteger contra os danos psicomotores causados pelo estado tipo-depressivo advindos da administração de LPS, além de possivelmente ser capaz de agir sinergicamente com o LPS quando se trata de danos cognitivos, intensificando-os.

As evidências na literatura relacionam o aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) e as alterações no sistema de defesa antioxidante do organismo, como alterações na via antioxidante do GSH, com a maior predisposição a uma ampla gama de doenças neuropsiquiátricas, como o delirium (BOZZA *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2020). Dessa maneira, a determinação dos níveis de GSH é um parâmetro essencial para o bom funcionamento do sistema nervoso. A glutathiona (GSH) é uma molécula de baixo peso molecular considerada uma das mais importantes defesas antioxidantes intracelular do organismo, os seus níveis em muitas situações de estresse oxidativo pode diminuir devido à saturação da via antioxidante do GSH, indicando um possível ataque nitrosativo e oxidativo no organismo (FORMAN *et al.*, 2009). Observou-se em nosso trabalho, uma diminuição dos níveis de glutathiona no grupo de animais sadios expostos à escopolamina tanto no hipocampo quanto no corpo estriado, indicando um possível estresse oxidativo mais evidente nessas áreas. Já em relação à levofloxacina, a sua administração na dose de 150 mg/kg foi também capaz de reduzir os níveis de GSH no hipocampo tanto dos animais sadios quanto dos animais doentes. No córtex pré-frontal (CPF) não foi possível observar alterações significativas nos níveis de GSH.

Sabe-se, portanto, que em situações em que condições neuropsiquiátricas se instalam devido ao fator neuroinflamação, os níveis das defesas antioxidantes, como o GSH, se encontram reduzidos e os níveis de fatores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , nitrito e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), encontram-se aumentados (HAHAD *et al.*, 2020; HERYĆ *et al.*, 2022).

Na análise histopatológica de nosso trabalho foram avaliados diferentes parâmetros indicativos de inflamação nas três áreas cerebrais de interesse, sendo eles: neurodegeneração evidenciada por formação de halos, presença de edema, infiltrado leucocitário, presença de núcleo picnótico dos corpos neuronais e células gliais, congestão vascular, gliose e hemorragia. Os resultados demonstram que no hipocampo dos animais

sadios e doentes expostos à escopolamina e à levofloxacina na dose de 100 mg/kg e 150 mg/kg existe o indicativo de uma neurodegeneração mais acentuada quando comparado ao grupo controle, além da presença de um leve edema, vacuolização, leve infiltrado eosinofílico, núcleo picnóticos em evidência e congestão vascular em todos os grupos expostos a essas substâncias. No córtex pré-frontal os resultados se encontram similares ao hipocampo, porém com exacerbação de edema e gliose nos grupos sadios e doentes tratados com escopolamina e nos grupos doentes tratados com levofloxacina na dose de 100 mg/kg, ademais, no CPF conseguiu-se atestar a presença de hemorragia nos animais sadios expostos à escopolamina e nos animais doentes expostos à escopolamina e à LEV 100. Já no corpo estriado os resultados se assemelham bastante aos encontrados no hipocampo dos animais experimentais, com exceção à gliose evidenciada em todos os grupos com exceção ao controle. É sabido, portanto, que no início de algumas síndromes causadoras de déficit cognitivo e de atenção existe uma resposta pró-inflamatória aguda mais acentuada no sistema nervoso central, levando a alterações tanto histopatológicas como neuroquímicas das células cerebrovasculares (KODALI et al, 2021). Os achados de nosso estudo sugerem, em síntese, que as alterações histopatológicas presentes em áreas cerebrais inflamadas, em grupos sadios e doentes, em conjunto com as alterações neuroquímicas causadas pela administração de levofloxacina podem ser fatores de importância ímpar no desencadeamento do delirium. Além disso, vale ressaltar que apesar das alterações presentes nos grupos de animais doentes serem mais significativas, os grupos de animais sadios (não expostos ao LPS) também sofreram essas alterações.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica de importância ímpar no que concerne à manutenção da homeostase corporal e na patogênese de diversas doenças (KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016). A função periférica do TNF- $\alpha$  também se atribui ao sistema nervoso central, sendo ele utilizado como um biomarcador para neuroinflamação em conjunto com outras citocinas e parâmetros. Estudos recentes demonstraram que essa citocina pode estar associada com condições neuropsiquiátricas relacionadas ao declínio cognitivo, como o Alzheimer ou até mesmo o delirium (WANG *et al.*, 2023). No entanto, a literatura mais recente aponta a relação entre o fator de necrose tumoral alfa e o delirium como indireta, ou seja, o TNF- $\alpha$  não seria um fator contribuinte para a origem da síndrome, mas sim um biomarcador encontrado em níveis alterados de forma secundária devido à cascata de resposta inflamatória gerada pela condição (YU *et al.*, 2023). Dessa maneira, como o TNF- $\alpha$  periférico pode ter seus níveis aumentados em uma síndrome como o delirium, nosso estudo buscou investigar os seus níveis no soro dos

animais de todos os grupos experimentais utilizados. Os resultados demonstraram aumento significativo nos níveis de TNF- $\alpha$  dos animais sadios tratados com escopolamina e com levofloxacina na dose de 150 mg/kg quando comparado aos animais tratados com salina. No grupo de animais doentes (expostos ao LPS) foi obtido um resultado similar aos animais sadios, com um aumento na concentração de citocina no grupo ESC. Os dados coletados acerca do TNF- $\alpha$  em nossos grupos experimentais faz-se refletir sobre o fato de que o comportamento neuroquímico em relação a essa citocina entre os grupos tratados com escopolamina - um antagonista colinérgico sabidamente conhecido por causar sintomas tipo-delirium e delirium - e os grupos expostos à levofloxacina na dose de 150 mg/kg são bastante semelhantes. Assim a levofloxacina é possivelmente capaz de gerar alguns dos sintomas tipo-delirium a partir do mesmo mecanismo neuroinflamatório que a escopolamina. No entanto, maiores estudos são necessários para a elucidação completa dos mecanismos de reações adversas relacionadas ao uso de levofloxacina.

A interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) é um importante marcador pró-inflamatório que possui seus níveis aumentados devido, principalmente, à formação de um inflamassoma estrutural chamado de NLRP3, como também devido a um estado crônico de ativação de macrófagos (XU; NÚÑEZ, 2023). O inflamassoma NLRP3 possui capacidade de gerar piores desfechos clínicos para pacientes com Alzheimer, assim como gerar efeitos deletérios como o delirium a partir de uma exacerbação da neuroinflamação e disfunção da rede neuronal (LOPEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2021). No presente trabalho, mensuramos os níveis de IL-1 $\beta$  no soro dos camundongos utilizados e encontraram-se níveis significativamente aumentados da citocina nos grupos sadios e doentes tratados com escopolamina em comparação ao controle, o que está em conformidade com o que está descrito em literatura científica (CHEON *et al.*, 2021). No entanto, os níveis de IL-1 $\beta$  encontrados foram reduzidos nos animais doentes tratados com LEV 150. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de algumas fluoroquinolonas, como ciprofloxacina e levofloxacina possuírem provavelmente a capacidade de produzir um efeito protetor anti-inflamatório, ao menos em parte, a partir da via de ativação de TLR4 e NF- $\kappa$ B (ZUSSO *et al.*, 2019).

Em relação aos níveis de nitrito, biomarcador apropriado para indicar ataque nitrosativo ao organismo, foi realizada a sua dosagem em três principais áreas cerebrais relacionadas ao delirium, sendo elas: hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal. No hipocampo, área responsável pela manutenção do humor, memória de curto prazo e aspectos cognitivos, a concentração de nitrito se mostrou elevada nos animais sadios tratados com escopolamina, levofloxacina na dose de 100 mg/kg e de 150 mg/kg, com um número mais

proeminente nos grupos ESC e LEV 150. Já nos animais doentes, houve um leve aumento de nitrito no grupo ESC em relação ao controle. No entanto, o grupo LEV 150 mostrou níveis elevados em relação ao grupo LEV 100. Já no córtex pré-frontal encontramos um aumento considerável dos níveis de nitrito em todos os grupos dos animais sadios com exceção ao controle. Desta forma, tanto ESC quanto LEV 100 e LEV 150 foram capazes de gerar tal alteração, sendo aquela dos níveis causados pela ESC e pela LEV 150 mais importante. No córtex pré-frontal dos animais doentes não foram encontrados resultados significativos em relação à concentração de nitrito. No corpo estriado, por sua vez, encontrou-se um aumento nos níveis de nitrito apenas nos animais sadios expostos à escopolamina. Esses dados explicitados contribuem para a teoria de que a levofloxacina é capaz de agir de forma similar à escopolamina no contexto de neuroinflamação causada por ataque nitrosativo. No entanto, como demonstrado nos dados descritos, o impacto nos níveis do marcador de estresse nitrosativo se mostrou mais relevante no hipocampo, isto sugere que a levofloxacina pode ser capaz de causar disfunção na rede neuronal colinérgica a partir do mecanismo neuroinflamatório no hipocampo.

A peroxidação lipídica é um dos principais processos responsáveis por gerar complexos altamente reativos no corpo humano, o que posteriormente gera estresse oxidativo acentuado no organismo. No processo de peroxidação lipídica se originam produtos primários tais como: radicais lipídicos peróxil e hidroperóxidos, assim como os produtos secundários como malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal. O MDA tem sido utilizado amplamente como um ótimo marcador de peroxidação lipídica por sua facilidade de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o principal produto desta reação observado durante o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Com isso, o TBARS é considerado um bom marcador para estresse oxidativo (LEON; BORGES, 2022). Estudos demonstraram níveis aumentados de MDA tanto no pré-clínico em camundongos idosos, como em pacientes com delirium pós-operatório (KARLIDAG et al, 2006; ZHU *et al.*, 2024). Com isso, foram avaliados os níveis de MDA em diferentes áreas cerebrais, como hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal, a partir do ensaio de TBARS em nosso trabalho. Os resultados do hipocampo demonstram aumento dos níveis de MDA no grupo de animais sadios expostos à escopolamina. No entanto, os grupos com levofloxacina na dose de 100 mg/kg e 150 mg/kg não demonstraram alterações significativas nos níveis de MDA dos animais sadios. Já nos animais doentes, curiosamente, a escopolamina não foi capaz de aumentar os níveis de MDA no hipocampo. A levofloxacina na dose de 150 mg/kg foi capaz de aumentar significativamente os níveis de TBARS nessa área cerebral, isto pode indicar um efeito mais

estressor da levofloxacina quando o indivíduo se encontra submetido a uma situação de doença, estresse psicológico e infecção. No córtex pré-frontal, os resultados se encontraram bastante semelhantes com os do hipocampo, com a escopolamina alterando os níveis de MDA nos animais sadios e a levofloxacina alterando os níveis de MDA nos animais doentes (expostos ao LPS) quando comparado ao grupo controle. Ademais, no corpo estriado os dados obtidos mostram um aumento significativo de TBARS nos animais sadios expostos à escopolamina e à levofloxacina na dose de 150 mg/kg. Porém, nos animais doentes não foram observadas alterações relevantes nos níveis de MDA no corpo estriado. O desfecho da análise dos resultados obtidos no teste de TBARS nas três áreas cerebrais demonstra um comportamento homogêneo das substâncias, com a escopolamina sendo capaz de provocar o aumento na concentração de MDA nas três áreas dos animais sadios, e a levofloxacina na dose de 150 mg/kg potencialmente aumentando os níveis de malondialdeído nos animais doentes (expostos ao LPS), com exceção do corpo estriado, em que a LEV 150 foi capaz de alterar os níveis dos animais sadios mas não dos doentes. Isto indica um efeito estressor mais proeminente no hipocampo e no córtex pré-frontal por parte da LEV 150, gerando um estresse oxidativo mais acentuado nessas áreas, o que leva possivelmente à disfunção da rede neuronal, principalmente de neurônios colinérgicos.

Para avaliar de forma mais direta a ativação inflamatória no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal, foram realizadas as marcações por imunohistoquímica DAB+ peroxidase em diferentes áreas do hipocampo dos camundongos, como CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD) utilizando o IBA1, um importante marcador de reatividade microglial, e o GFAP, um importante marcador de reatividade astrocitária. Esses marcadores são conhecidos por estarem elevados e mais evidentes em situações de inflamação e em modelos de delirium por LPS (FURMAN et al, 2023). Os resultados obtidos são expressos por um parâmetro conhecido como densidade óptica (DO), um método quantitativo efetivo para análise de imagens advindas dessa técnica de imunomarcção (JAFARI; HUNGER, 2017). Como a expressão de astrócitos são importantes indicadores para neurodegeneração e reparo neuronal, com o uso de anticorpo anti-GFAP analisaram-se os resultados imunohistoquímicos para CA1, CA3 e GD, e observou-se um aumento importante na DO do GD nos grupos de animais sadios tratados com ESC em relação ao controle, resultado que se manteve na maior parte de todas as áreas avaliadas do hipocampo. A escopolamina sabidamente promove déficit cognitivo e um aumento na expressão astrocitária e proteína anti-GFAP (MEMUDU; ADEWUMI, 2021), o que está em concordância com o resultado obtido em nosso estudo. Ademais os níveis de DO no GD do grupo sadio tratado com ESC se mostraram aumentados

de forma importante em relação aos tratamentos com LEV 100 e LEV 150, além de uma densidade óptica menor desses grupos nos animais doentes em relação ao respectivo controle, o que pode demonstrar que os efeitos colaterais no SNC causados por essas drogas não estão relacionadas diretamente com a ação dos astrócitos. No CA1 os resultados avaliados se mantiveram aos moldes do GD. No CA3 os valores relacionados à DO dos animais sadios tratados com ESC se mantiveram elevados significativamente, além do aumento significativo de DO observado em todas as áreas de nosso controle positivo doente exposto ao LPS, o que está conforme a literatura científica, já que o LPS é sabidamente causador de inflamação aguda e ativação astrocitária (LI *et al*, 2021).

Como a micróglia está diretamente relacionada às condições em que há déficit cognitivo e de atenção, como alzheimer e delirium (NI *et al*, 2023), foi avaliada também a expressão da proteína anti-IBA-1 em CA1, CA2 e GD dos camundongos experimentais. Em nossos resultados observou-se que o padrão de aumento da densidade óptica nos animais sadios tratados com escopolamina se manteve em todas as áreas do hipocampo observadas, além dos resultados relacionados ao aumento de DO no controle doente em relação ao controle sadio, ambos resultados condizentes com o que encontramos na literatura atual. No CA1 não foram observados resultados importantes. Já no CA2 e GD observou-se um aumento significativo de DO nos animais doentes tratados com LEV 100 e LEV 150 quando comparados ao respectivo controle doente, o que pode indicar um papel importante na elucidação do delirium advindo do uso de levofloxacino em pacientes doentes em UTI, já que há uma maior ativação microglial no CA2 nos animais doentes tratados com LEV 100 e ainda uma ativação ainda mais importante no GD nos animais doentes tratados com LEV 150. Tendo em vista que a micróglia é responsável pela neuroproteção durante quadros inflamatórios no SNC, a sua hiperatividade é observada amplamente em diversos transtornos neuropsiquiátricos (FANG *et al*, 2023). Em síntese, a análise imunohistoquímica de GFAP e IBA-1 sugere que a levofloxacina pode ter um papel importante na neuroinflamação e no dano neuronal causado ao CA1 e GD em hipocampo de camundongos doentes desafiados ao LPS.

De acordo com a hipótese de neurotransmissão do delirium, é postulado que a síndrome decorre de uma menor transmissão colinérgica em conjunto com um aumento de transmissão dopaminérgica. Ademais, essa hipótese aponta uma interação não somente entre as vias de dopamina com as vias de acetilcolina, mas também com as vias gabaérgicas e glutamatérgicas (MALDONADO, 2013). Em nosso estudo buscou-se avaliar os efeitos nos níveis de neurotransmissores, como dopamina, glutamato e GABA, em diferentes áreas

cerebrais causados pela levofloxacin na dose de 100 mg/kg e 150 mg/kg. Em relação à dopamina foi quantificado tanto a sua forma ativa quanto um de seus principais metabólitos, o DOPAC, no cérebro dos camundongos utilizados nos experimentos comportamentais. A literatura indica que o antagonismo nos receptores muscarínicos pela escopolamina leva a um efeito excitatório na via dopaminérgica, aumentando os níveis de dopamina e seus metabólitos em diferentes áreas cerebrais (GIOVANNI; SHI, 2009, PANDAREESH *et al.*, 2016). Em contrapartida, nossos resultados demonstraram uma pequena redução nos níveis de dopamina no cérebro dos animais sadios expostos à escopolamina e resultados não significativos nos animais doentes. Já no DOPAC, não houve alteração significativa dos níveis do metabólito em nenhum dos grupos. Já a respeito do glutamato e do GABA, sabe-se que os modelos envolvendo déficit cognitivo e ação antidepressiva rápida com escopolamina levam a um aumento de glutamato e uma redução de gaba no cérebro de camundongo (PANDAREESH *et al.*, 2016, YU *et al.*, 2018). Em concordância com a literatura, nossos achados apontam um aumento de glutamato no hipocampo dos animais sadios expostos à escopolamina e expostos à LEV 150. Os resultados encontrados demonstram que os níveis de glutamato no corpo estriado e no córtex pré-frontal não sofreram alterações significativas por nenhum dos grupos experimentais.

Em relação ao GABA, nossos resultados demonstram uma redução significativa nos níveis deste neurotransmissor no hipocampo e no córtex pré-frontal dos animais sadios e dos doentes (expostos ao LPS) tratados com escopolamina e com LEV 150. O que está em conformidade com a literatura atual, já que a inibição de interneurônios gabaérgicos no córtex pré-frontal é suficiente e necessária para gerar a resposta tipo-antidepressiva rápida sugerida para a escopolamina (FOGAÇA *et al.*, 2021), além de contribuir com as evidências de que a levofloxacin possui potencial inibitório de receptores GABA (AKAHANE; TAKAYAMA, 1993; AKAHANE *et al.*, 1994). Os resultados obtidos em nosso estudo apontam diretamente para uma ação similar da levofloxacin na dose de 150 mg/kg quando tratamos de efeitos nos níveis de neurotransmissão de glutamato e gaba. Isso pode sugerir que a LEV 150 possui o potencial de gerar alterações cognitivas também por conta de uma redução nos níveis de GABA e aumento dos níveis de glutamato, principalmente no hipocampo. Os resultados obtidos no corpo estriado não foram significativos. Contudo, mais estudos são necessários para a elucidação das vias responsáveis pelos efeitos tipo-delirium causados pela levofloxacin.

## 7 CONCLUSÃO

Em conclusão, no presente trabalho foi demonstrado de forma pioneira a capacidade de a levofloxacina, uma das fluoroquinolonas amplamente utilizada em unidades de terapia intensiva (UTI), como fator precipitante único, gerar as alterações neuroquímicas e comportamentais que classificamos como tipo-delirium em modelo animal. A levofloxacina demonstrou alterações similares nos resultados neuroquímicos e comportamentais quando comparada à escopolamina, um fármaco sabidamente responsável por gerar déficit cognitivo, delirium e sintomas tipo-delirium. O mecanismo de ação neurotóxico da levofloxacina está associado certamente ao seu fator inflamatório e possivelmente também ao seu fator disruptor na neurotransmissão de glutamato e GABA. Dessa forma, os sintomas tipo-delirium desencadeados pela administração de levofloxacina podem ser mais bem compreendidos a partir de uma visão multifatorial da síndrome, com fatores inflamatórios, níveis alterados de neurotransmissores e outros aspectos não avaliados em nosso trabalho, como distúrbios de sono-vigília, recuperação pós-cirurgia, entre outros. Considerando o grande impacto social e econômico gerado pelas reações adversas neuropsiquiátricas da levofloxacina, tais como os sintomas tipo-delirium e delirium, convém imprescindivelmente novos estudos avaliando níveis de acetilcolina, expressão gênica, atividade de receptores dos interneurônios gabaérgicos. Ademais estudos translacionais são necessários com o escopo de encontrar maior elucidação dos exatos mecanismos pelo qual a levofloxacina leva ao delirium em pacientes tanto saudáveis, quanto em unidade de terapia intensiva.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-AAL MAA, Abdel-aziz SA, Shaykoon MSA, Abuo-Rahma GEA. **Towards anticancer fluoroquinolones: A review article.** Arch Pharm (Weinheim). 2019 Jul;352(7):e1800376. doi: 10.1002/ardp.201800376. Epub 2019 Jun 19. PMID: 31215674.
- ADAM EH, Haas V, Lindau S, Zacharowski K, Scheller B. **Cholinesterase alterations in delirium after cardiosurgery: a German monocentric prospective study.** BMJ Open. 2020 Jan 14;10(1):e031212. doi: 10.1136/bmjopen-2019-031212. PMID: 31941763; PMCID: PMC7044931.
- AGUIAR, L.M.; Nobre, H.V. JR.; Macêdo, D.S.; Oliveira, A.A.; Freitas, R.M.; Vasconcelos, S.M.; Cunha, G.M.; Sousa, F.C.; Viana, G.S. **Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats.** Pharmacol Biochem Behav., v. 84, n. 3, pp.415-419, 2006.
- AGUILAR DIAZ DE LEON J, Borges CR. **Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay.** J Vis Exp. 2020 May 12;(159):10.3791/61122. doi: 10.3791/61122. PMID: 32478759; PMCID: PMC9617585.
- AKAHANE K, Kato M, Takayama S. **Involvement of inhibitory and excitatory neurotransmitters in levofloxacin- and ciprofloxacin-induced convulsions in mice.** Antimicrob Agents Chemother. 1993 Sep;37(9):1764-70. doi: 10.1128/AAC.37.9.1764. PMID: 7902066; PMCID: PMC188067.
- AKAHANE K, Tsutomi Y, Kimura Y, Kitano Y. **Levofloxacin, an optical isomer of ofloxacin, has attenuated epileptogenic activity in mice and inhibitory potency in GABA receptor binding.** Chemotherapy. 1994;40(6):412-7. doi: 10.1159/000239301. PMID: 7842825.
- AL-HOODAR, Rasha & Lazarus Rathinasamy, Eilean & Al Omari, Omar & Al Zaabi, Omar. (2022). **Incidence, Associated Factors, and Outcome of Delirium among Patients Admitted to ICUs in Oman.** Critical Care Research and Practice. 2022. 1-8. 10.1155/2022/4692483.
- ARCHER, J. **Tests for emotionality in rats and mice: a review.** Animal Behaviour, v. 21, n. 2, pp. 205-235, maio 1973.
- BAGGIO D, Ananda-Rajah MR. **Fluoroquinolone antibiotics and adverse events.** Aust Prescr. 2021 Oct;44(5):161-164. doi: 10.18773/austprescr.2021.035. Epub 2021 Oct 1. PMID: 34728881; PMCID: PMC8542490.
- BARTON GM. **A calculated response: control of inflammation by the innate immune system.** J Clin Invest. 2008 Feb;118(2):413-20. doi: 10.1172/JCI34431. PMID: 18246191; PMCID: PMC2214713.
- BHATTACHARYYA S, Darby RR, Raibagkar P, Gonzalez Castro LN, Berkowitz AL. **Antibiotic-associated encephalopathy.** Neurology. 2016 Mar 8;86(10):963-71. doi:

10.1212/WNL.0000000000002455. Epub 2016 Feb 17. Erratum in: *Neurology*. 2016 May 31;86(22):2116. PMID: 26888997.

BISACCHI GS. **Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded "Discovery Story"**. *J Med Chem*. 2015 Jun 25;58(12):4874-82. doi: 10.1021/jm501881c. Epub 2015 Mar 12. PMID: 25738967.

CAO S, Wu Y, Gao Z, Tang J, Xiong L, Hu J, Li C. **Automated phenotyping of postoperative delirium-like behaviour in mice reveals the therapeutic efficacy of dexmedetomidine**. *Commun Biol*. 2023 Aug 2;6(1):807. doi: 10.1038/s42003-023-05149-7. PMID: 37532767; PMCID: PMC10397202.

CECERSKA-HERYĆ E, Polikowska A, Serwin N, Roszak M, Grygorcewicz B, Heryć R, Michalczyk A, Dołęgowska B. **Importance of oxidative stress in the pathogenesis, diagnosis, and monitoring of patients with neuropsychiatric disorders, a review**.

CEREJEIRA J, Lagarto L, Mukaetova-Ladinska EB. **The immunology of delirium**. *Neuroimmunomodulation*. 2014;21(2-3):72-8. doi: 10.1159/000356526. Epub 2014 Feb 14. PMID: 24557038.

CHEON SY, Koo BN, Kim SY, Kam EH, Nam J, Kim EJ. **Scopolamine promotes neuroinflammation and delirium-like neuropsychiatric disorder in mice**. *Sci Rep*. 2021 Apr 16;11(1):8376. doi: 10.1038/s41598-021-87790-y. PMID: 33863952; PMCID: PMC8052461.

CHONG CM, Ai N, Ke M, Tan Y, Huang Z, Li Y, Lu JH, Ge W, Su H. **Roles of Nitric Oxide Synthase Isoforms in Neurogenesis**. *Mol Neurobiol*. 2018 Mar;55(3):2645-2652. doi: 10.1007/s12035-017-0513-7. Epub 2017 Apr 18. PMID: 28421538.

COOKE JR, Ancoli-Israel S. **Normal and abnormal sleep in the elderly**. *Handb Clin Neurol*. 2011;98:653-65. doi: 10.1016/B978-0-444-52006-7.00041-1. PMID: 21056216; PMCID: PMC3142094.

COSTA AP, Vieira C, Bohner LO, Silva CF, Santos EC, De Lima TC, Lino-de-Oliveira C. **A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice**. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013 Aug 1;45:150-5. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.05.002. Epub 2013 May 9. PMID: 23665107.

DAOU M, Telias I, Younes M, Brochard L, Wilcox ME. **Abnormal Sleep, Circadian Rhythm Disruption, and Delirium in the ICU: Are They Related?** *Front Neurol*. 2020 Sep 18;11:549908. doi: 10.3389/fneur.2020.549908. PMID: 33071941; PMCID: PMC7530631.

DAS UN. **Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation**. *Ann Hepatol*. 2012 May-Jun;11(3):409-11. PMID: 22481463.

DENAYER, Tinneke, Thomas Stohr and Maarten van Roy. **"Animal models in translational medicine: Validation and prediction."** *New Horizons in Translational Medicine 2* (2014): 5-11.

DI GIOVANNI G, Shi WX. **Effects of scopolamine on dopamine neurons in the substantia nigra: role of the pedunculopontine tegmental nucleus**. *Synapse*. 2009 Aug;63(8):673-80. doi: 10.1002/syn.20650. PMID: 19360852.

DULKO E, Jedrusiak M, Osuru HP, Atluri N, Illendula M, Davis EM, Beenhakker MP, Lunardi N. **Sleep Fragmentation, Electroencephalographic Slowing, and Circadian Disarray in a Mouse Model for Intensive Care Unit Delirium.** *Anesth Analg.* 2023 Jul 1;137(1):209-220. doi: 10.1213/ANE.0000000000006524. Epub 2023 May 16. PMID: 37192134.

DUNNE SS, Coffey JC, Konje S, Gasior S, Clancy CC, Gulati G, Meagher D, Dunne CP. **Biomarkers in delirium: A systematic review.** *J Psychosom Res.* 2021 Aug;147:110530. doi: 10.1016/j.jpsychores.2021.110530. Epub 2021 Jun 1. PMID: 34098376.

EGBERTS A, Fekkes D, Wijnbeld EH, van der Ploeg MA, van Saase JL, Ziere G, van der Cammen TJ, Mattace-Raso FU. **Disturbed Serotonergic Neurotransmission and Oxidative Stress in Elderly Patients with Delirium.** *Dement Geriatr Cogn Dis Extra.* 2015 Dec 3;5(3):450-8. doi: 10.1159/000440696. PMID: 26955379; PMCID: PMC4777943.

ELLIOTT R, Nathaney A. **Typical sleep patterns are absent in mechanically ventilated patients and their circadian melatonin rhythm is evident but the timing is altered by the ICU environment.** *Aust Crit Care.* 2014 Aug; 27(3):151-3. doi: 10.1016/j.aucc.2014.01.001. Epub 2014 Feb 18. PMID: 24556537.

FANG S, Wu Z, Guo Y, Zhu W, Wan C, Yuan N, Chen J, Hao W, Mo X, Guo X, Fan L, Li X, Chen J. **Roles of microglia in adult hippocampal neurogenesis in depression and their therapeutics.** *Front Immunol.* 2023 Oct 10;14:1193053. doi: 10.3389/fimmu.2023.1193053. PMID: 37881439; PMCID: PMC10597707.

FIELD RH, Gossen A, Cunningham C. **Prior pathology in the basal forebrain cholinergic system predisposes to inflammation-induced working memory deficits: reconciling inflammatory and cholinergic hypotheses of delirium.** *J Neurosci.* 2012 May 2;32(18):6288-94. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4673-11.2012. PMID: 22553034; PMCID: PMC3359617.

FOGAÇA MV, Wu M, Li C, Li XY, Picciotto MR, Duman RS. **Inhibition of GABA interneurons in the mPFC is sufficient and necessary for rapid antidepressant responses.** *Mol Psychiatry.* 2021 Jul;26(7):3277-3291. doi: 10.1038/s41380-020-00916-y. Epub 2020 Oct 17. PMID: 33070149; PMCID: PMC8052382.

FONKEN LK, Weil ZM, Nelson RJ. **Mice exposed to dim light at night exaggerate inflammatory responses to lipopolysaccharide.** *Brain Behav Immun.* 2013 Nov; 34:159-63. doi: 10.1016/j.bbi.2013.08.011. Epub 2013 Sep 6. PMID: 24012645.

FORMAN HJ, Zhang H, Rinna A. **Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis.** *Mol Aspects Med.* 2009 Feb-Apr;30(1-2):1-12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006. Epub 2008 Aug 30. PMID: 18796312; PMCID: PMC2696075.

FURMAN A, Ferguson NM, Lafrenaye AD, Sato-Bigbee C, Dunbar E, Sullivan T, Neigh GN, O'Meara AMI. **Understanding sedative effects within the context of acute neuroinflammation in the developing brain: Potential induction of delirium-like behaviors.** *Exp Neurol.* 2023 Sep;367:114453. doi: 10.1016/j.expneurol.2023.114453. Epub 2023 Jun 10. PMID: 37302746.

FUNES-AVILA JA, Ledesma-Heyer JP, Navarrete-Reyes AP, Chavira-Ramírez R, Boeck-Quirasco L, Aguilar-Navarro S. **Association between high serum estradiol levels and delirium among hospitalized elderly women.** *Rev Invest Clin.* 2015 Jan-Feb;67(1):20-4. PMID: 25857580.

GARCEZ FB, Avelino-Silva TJ, Castro REV, Inouye SK. **Delirium in older adults.** *Geriatr Gerontol Aging.* 2021;15:e0210032. <https://doi.org/10.53886/gga.e0210032>.

GREEN, L. *et al.*, **Preference reversal and self- control:** choice as a function of reward amount and delay. *Behav. Anal. Lett.*, v. 1, pp. 43–51, 1981.

HAHAD O, Lelieveld J, Birklein F, Lieb K, Daiber A, Münzel T. **Ambient Air Pollution Increases the Risk of Cerebrovascular and Neuropsychiatric Disorders through Induction of Inflammation and Oxidative Stress.** *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 17;21(12):4306. doi: 10.3390/ijms21124306. PMID: 32560306; PMCID: PMC7352229.

HARTINGER JM, Dvorackova E, Myslivecek M, Hruskova Z, Satny M, Zlatohlavek L, Krizova J, Sima M, Tesar V, Slanar O. **The frequency of, and predisposing risk factors for, ciprofloxacin-induced neuro-psychiatric adverse drug reactions.** *Bratisl Lek Listy.* 2023;124(10):779-782. doi: 10.4149/BLL\_2023\_120. PMID: 37789796.

HOLMES C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, Culliford D, Perry VH. **Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease.** *Neurology.* 2009 Sep 8;73(10):768-74. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181b6bb95. PMID: 19738171; PMCID: PMC2848584.

HÖLTER SM, Garrett L, Einicke J, Sperling B, Dirscherl P, Zimprich A, Fuchs H, Gailus-Durner V, Hrabě de Angelis M, Wurst W. **Assessing Cognition in Mice.** *Curr Protoc Mouse Biol.* 2015 Dec 2;5(4):331-358. doi: 10.1002/9780470942390.mo150068. PMID: 26629775.

HOOGLAND IC, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. **Systemic inflammation and microglial activation:** systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation.* 2015 Jun 6;12:114. doi: 10.1186/s12974-015-0332-6. PMID: 26048578; PMCID: PMC4470063.

HSHIEH TT, Fong TG, Marcantonio ER, Inouye SK. **Cholinergic deficiency hypothesis in delirium:** a synthesis of current evidence. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008 Jul;63(7):764-72. doi: 10.1093/gerona/63.7.764. PMID: 18693233; PMCID: PMC2917793.

HUONG, N.T.T.; Matsumoto, K.; Kasai, R.; Yamasaki, K.; Watanabe, H. **In vitro antioxidant activity of Vietnamese ginseng saponin and its components.** *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 21, n. 9, pp. 978-981, 1998.

IBITOYE OB, Aliyu NO, Ajiboye TO. **Protective Influence of *Phyllanthus Muellarianus* on Ciprofloxacin-Induced Neurotoxicity in Male Rats.** *J Diet Suppl.* 2020;17(3):321-335. doi: 10.1080/19390211.2019.1586805. Epub 2019 May 8. PMID: 31066327.

IGLSELDER B, Frühwald T, Jagsch C. **Delirium in geriatric patients.** *Wien Med Wochenschr.* 2022 Apr;172(5-6):114-121. doi: 10.1007/s10354-021-00904-z. Epub 2022 Jan 10. PMID: 35006521; PMCID: PMC8744373.

INOUYE SK, Charpentier PA. **Precipitating factors for delirium in hospitalized elderly persons. Predictive model and interrelationship with baseline vulnerability.** JAMA. 1996 Mar 20;275(11):852-7. PMID: 8596223.

INOUYE SK, Westendorp RG, Saczynski JS. **Delirium in elderly people.** Lancet. 2014 Mar 8;383(9920):911-22. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60688-1. Epub 2013 Aug 28. PMID: 23992774; PMCID: PMC4120864.

JAFARI SM, Hunger RE. **IHC Optical Density Score: A New Practical Method for Quantitative Immunohistochemistry Image Analysis.** Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2017 Jan;25(1):e12-e13. doi: 10.1097/PAI.0000000000000370. PMID: 27093452.

JALLEH R, Koh K, Choi B, Liu E, Maddison J, Hutchinson MR. **Role of microglia and toll-like receptor 4 in the pathophysiology of delirium.** Med Hypotheses. 2012 Dec;79(6):735-9. doi: 10.1016/j.mehy.2012.08.013. Epub 2012 Sep 10. PMID: 22975447.

KALLIOLIAS GD, Ivashkiv LB. **TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies.** Nat Rev Rheumatol. 2016 Jan;12(1):49-62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169. Epub 2015 Dec 10. PMID: 26656660; PMCID: PMC4809675.

KARLIDAG R, Unal S, Sezer OH, Bay Karabulut A, Battaloğlu B, But A, Ozcan C. **The role of oxidative stress in postoperative delirium.** Gen Hosp Psychiatry. 2006 Sep-Oct;28(5):418-23. doi: 10.1016/j.genhosppsych.2006.06.002. PMID: 16950378.

KODALI MC, Chen H, Liao FF. **Temporal unsnarling of brain's acute neuroinflammatory transcriptional profiles reveals panendothelitis as the earliest event preceding microgliosis.** Mol Psychiatry. 2021 Aug;26(8):3905-3919. doi: 10.1038/s41380-020-00955-5. Epub 2020 Dec 8. PMID: 33293688; PMCID: PMC7722246.

KRAEUTER, A.K.; Guest, P.C.; Sarnyai, Z. **The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents.** Methods Mol Biol, v. 1916, p. 69-74, 2019.

LAIRD MH, Rhee SH, Perkins DJ, Medvedev AE, Piao W, Fenton MJ, Vogel SN. **TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling.** J Leukoc Biol. 2009 Jun;85(6):966-77. doi: 10.1189/jlb.1208763. Epub 2009 Mar 16. PMID: 19289601; PMCID: PMC2698589.

LAKSTYGAL AM, Kolesnikova TO, Khatsko SL, Zabegalov KN, Volgin AD, Demin KA, Shevyrin VA, Wappler-Guzzetta EA, Kalueff AV. **DARK Classics in Chemical Neuroscience: Atropine, Scopolamine, and Other Anticholinergic Deliriant Hallucinogens.** ACS Chem Neurosci. 2019 May 15;10(5):2144-2159. doi: 10.1021/acschemneuro.8b00615. Epub 2019 Jan 10. PMID: 30566832.

LI W, Ali T, He K, Liu Z, Shah FA, Ren Q, Liu Y, Jiang A, Li S. **Ibrutinib alleviates LPS-induced neuroinflammation and synaptic defects in a mouse model of depression.** Brain Behav Immun. 2021 Feb;92:10-24. doi: 10.1016/j.bbi.2020.11.008. Epub 2020 Nov 10. PMID: 33181270.

LÔBO, Rômulo Rebouças; SILVA FILHO, Silvio R. B.; LIMA, Nereida K. C.; FERRIOLLI, Eduardo; MORIGUTI, Julio C. **Delirium**. *Medicina (Ribeirão Preto)*, Ribeirão Preto, Brasil, v. 43, n. 3, p. 249–257, 2010. DOI: 10.11606/issn.2176-7262.v43i3p249-257. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/182..> Acesso em: 30 maio. 2024.

LOPEZ-RODRIGUEZ AB, Hennessy E, Murray CL, Nazmi A, Delaney HJ, Healy D, Fagan SG, Rooney M, Stewart E, Lewis A, de Barra N, Scarry P, Riggs-Miller L, Boche D, Cunningham MO, Cunningham C. **Acute systemic inflammation exacerbates neuroinflammation in Alzheimer's disease: IL-1 $\beta$  drives amplified responses in primed astrocytes and neuronal network dysfunction**. *Alzheimers Dement*. 2021 Oct;17(10):1735-1755. doi: 10.1002/alz.12341. Epub 2021 Jun 3. PMID: 34080771; PMCID: PMC8874214.

LU Y, Chen L, Ye J, Chen C, Zhou Y, Li K, Zhang Z, Peng M. **Surgery/Anesthesia disturbs mitochondrial fission/fusion dynamics in the brain of aged mice with postoperative delirium**. *Aging (Albany NY)*. 2020 Jan 12;12(1):844-865. doi: 10.18632/aging.102659. Epub 2020 Jan 12. PMID: 31929114; PMCID: PMC6977661.

MALDONADO JR. **Delirium pathophysiology: An updated hypothesis of the etiology of acute brain failure**. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2018 Nov;33(11):1428-1457. doi: 10.1002/gps.4823. Epub 2017 Dec 26. PMID: 29278283.

\_\_\_\_\_. **Neuropathogenesis of delirium: review of current etiologic theories and common pathways**. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2013 Dec;21(12):1190-222. doi: 10.1016/j.jagp.2013.09.005. PMID: 24206937.

MARCANTONIO ER. **Delirium in Hospitalized Older Adults**. *N Engl J Med*. 2017;377(15):1456-1466.

MARCANTONIO ER, Rudolph JL, Culley D, Crosby G, Alsop D, Inouye SK. **Serum biomarkers for delirium**. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006 Dec;61(12):1281-6. doi: 10.1093/gerona/61.12.1281. PMID: 17234821.

MATTISON MLP. **Delirium**. *Ann Intern Med*. 2020 Oct 6;173(7):ITC49-ITC64. doi: 10.7326/AITC202010060. PMID: 33017552.

MCCUSKER RH, Kelley KW. **Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior**. *J Exp Biol*. 2013 Jan 1;216(Pt 1):84-98. doi: 10.1242/jeb.073411. PMID: 23225871; PMCID: PMC3515033.

MEMUDU AE, Adewumi AE. **Alpha lipoic acid ameliorates scopolamine induced memory deficit and neurodegeneration in the cerebello-hippocampal cortex**. *Metab Brain Dis*. 2021 Oct;36(7):1729-1745. doi: 10.1007/s11011-021-00720-9. Epub 2021 May 22. PMID: 34021876.

NASEHI M, Mohammadi-Mahdiabadi-Hasani MH, Ebrahimi-Ghiri M, Zarrindast MR. **Additive interaction between scopolamine and nitric oxide agents on immobility in the forced swim test but not exploratory activity in the hole-board**. *Psychopharmacology (Berl)*. 2019 Nov;236(11):3353-3362. doi: 10.1007/s00213-019-05294-0. Epub 2019 Jun 7. PMID: 31175384.

NEAME M, King C, Riordan A, Iyer A, Kneen R, Sinha I, Hawcutt DB. **Seizures and**

**quinolone antibiotics in children:** a systematic review of adverse events. *Eur J Hosp Pharm.* 2020 Mar;27(2):60-64. doi: 10.1136/ejpharm-2018-001805. Epub 2019 Jan 28. PMID: 32133130; PMCID: PMC7043247.

Ni H, Liao Y, Zhang Y, Lu H, Huang Z, Huang F, Zhang Z, Dong Y, Wang Z, Huang Y. **Levistilide A ameliorates neuroinflammation via inhibiting JAK2/STAT3 signaling for neuroprotection and cognitive improvement in scopolamine-induced Alzheimer's disease mouse model.** *Int Immunopharmacol.* 2023 Nov;124(Pt A):110783. doi: 10.1016/j.intimp.2023.110783. Epub 2023 Aug 22. PMID: 37619415.

NISHIKAWA Y, Choudhury ME, Mikami K, Matsuura T, Kubo M, Nagai M, Yamagishi S, Doi T, Hisai M, Yamamoto H, Yajima C, Nishihara T, Abe N, Yano H, Yorozuya T, Tanaka J. **Anti-inflammatory effects of dopamine on microglia and a D1 receptor agonist ameliorates neuroinflammation of the brain in a rat delirium model.** *Neurochem Int.* 2023 Feb;163:105479. doi: 10.1016/j.neuint.2023.105479. Epub 2023 Jan 4. PMID: 36608872.

NORDEN DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP. **Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge.** *Glia.* 2016 Feb;64(2):300-16. doi: 10.1002/glia.22930. Epub 2015 Oct 15. PMID: 26470014; PMCID: PMC4707977.

NUMAN T, van den Boogaard M, Kamper AM, Rood PJT, Peelen LM, Slooter AJC; Dutch **Delirium Detection Study Group. Recognition of Delirium in Postoperative Elderly Patients: A Multicenter Study.** *J Am Geriatr Soc.* 2017 Sep;65(9):1932-1938. doi: 10.1111/jgs.14933. Epub 2017 May 12. PMID: 28497575.

ODEH M, Kogan Y, Paz A, Elias N. **Delirium induced by levofloxacin.** *J Clin Neurosci.* 2019 Aug;66:262-264. doi: 10.1016/j.jocn.2019.05.055. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31178301.

PANDAREESH MD, Anand T, Khanum F. **Cognition Enhancing and Neuromodulatory Propensity of Bacopa monniera Extract Against Scopolamine Induced Cognitive Impairments in Rat Hippocampus.** *Neurochem Res.* 2016 May;41(5):985-99. doi: 10.1007/s11064-015-1780-1. Epub 2015 Dec 16. PMID: 26677075.

PERRY VH. **Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration.** *Acta Neuropathol.* 2010 Sep;120(3):277-86. doi: 10.1007/s00401-010-0722-x. Epub 2010 Jul 20. PMID: 20644946.

PHAM TDM, Ziora ZM, Blaskovich MAT. **Quinolone antibiotics.** *Medchemcomm.* 2019 Jun 28;10(10):1719-1739. doi: 10.1039/c9md00120d. PMID: 31803393; PMCID: PMC6836748.

PIOTROWICZ K, Klich-Rączka A, Pac A, Zdzienicka A, Grodzicki T. **The diurnal profile of melatonin during delirium in elderly patients--preliminary results.** *Exp Gerontol.* 2015 Dec;72:45-9. doi: 10.1016/j.exger.2015.09.007. Epub 2015 Sep 11. PMID: 26368540.

PISANI MA, Friese RS, Gehlbach BK, Schwab RJ, Weinhouse GL, Jones SF. **Sleep in the intensive care unit.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 Apr 1;191(7):731-8. doi: 10.1164/rccm.201411-2099CI. PMID: 25594808; PMCID: PMC5447310.

PORSOLT, R. D. *et al.*, **Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments.** *European Journal of Pharmacology*, v. 47, n. 4, pp. 379–391, fev. 1978.

RISSARDO JP, Caprara ALF. **Fluoroquinolone-Associated Movement Disorder: A Literature Review.** *Medicines (Basel)*. 2023 May 25;10(6):33. doi: 10.3390/medicines10060033. PMID: 37367728; PMCID: PMC10303425.

RUMP K, Adamzik M. **Epigenetic Mechanisms of Postoperative Cognitive Impairment Induced by Anesthesia and Neuroinflammation.** *Cells*. 2022 Sep 21;11(19):2954. doi: 10.3390/cells11192954. PMID: 36230916; PMCID: PMC9563723.

SARTER, M.; Bodewitz, G.; Stephens, D. N. **Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines.** *Psychopharmacology*, v. 94, n. 4, pp. 491–495, 1988.

SAKAI A. **Phrenitis: inflammation of the mind and the body.** *History of Psychiatry*. 1991;2(6):193-205. doi:10.1177/0957154X9100200606.

SENANARONG V, Vannasaeng S, Pongvarin N, *et al.* **Endogenous Estradiol in Elderly Individuals: Cognitive and Noncognitive Associations.** *Arch Neurol*. 2002;59(3):385–389. doi:10.1001/archneur.59.3.385.

SEPULVEDA E, Adamis D, Franco JG, Meagher D, Aranda S, Vilella E. **The complex interaction of genetics and delirium: a systematic review and meta-analysis.** *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2021 Aug;271(5):929-939. doi: 10.1007/s00406-021-01255-x. Epub 2021 Mar 29. PMID: 33779822.

SPARKMAN NL, Johnson RW. **Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress.** *Neuroimmunomodulation*. 2008;15(4-6):323-30. doi: 10.1159/000156474. Epub 2008 Nov 26. PMID: 19047808; PMCID: PMC2704383.

SUTTER R, Rüegg S, Tschudin-Sutter S. **Seizures as adverse events of antibiotic drugs: A systematic review.** *Neurology*. 2015 Oct 13;85(15):1332-41. doi: 10.1212/WNL.0000000000002023. Epub 2015 Sep 23. PMID: 26400582.

TOMÉ AM, Filipe A. **Quinolones: review of psychiatric and neurological adverse reactions.** *Drug Saf*. 2011 Jun 1;34(6):465-88. doi: 10.2165/11587280-000000000-00000. PMID: 21585220.

TRAVERS A, Muskhelishvili G. **DNA structure and function.** *FEBS J*. 2015 Jun;282(12):2279-95. doi: 10.1111/febs.13307. Epub 2015 Jun 2. PMID: 25903461.

VASUNILASHORN SM, Fong TG, Helfand BKI, Hshieh TT, Marcantonio ER, Metzger ED, Schmitt EM, Tabloski PA, Trivison TG, Gou Y, Jones RN, Inouye SK; BASIL Study Team. **Psychometric Properties of a Delirium Severity Score for Older Adults and Association With Hospital and Posthospital Outcomes.** *JAMA Netw Open*. 2022 Mar 1;5(3):e226129. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.6129. PMID: 35357447; PMCID: PMC8972033.

VELAGAPUDI R, Subramanian S, Xiong C, Porkka F, Rodriguiz RM, Wetsel WC,

Terrando N. **Orthopedic Surgery Triggers Attention Deficits in a Delirium-Like Mouse Model.** *Front Immunol.* 2019 Nov 19;10:2675. doi: 10.3389/fimmu.2019.02675. PMID: 31911786; PMCID: PMC6918861.

VOLGIN AD, Yakovlev OA, Demin KA, Alekseeva PA, Kyzar EJ, Collins C, Nichols DE, Kalueff AV. **Understanding Central Nervous System Effects of Deliriant Hallucinogenic Drugs through Experimental Animal Models.** *ACS Chem Neurosci.* 2019 Jan 16;10(1):143-154. doi: 10.1021/acschemneuro.8b00433. Epub 2018 Oct 16. PMID: 30252437.

WANG, J. **Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 430–440 (2002). <https://doi.org/10.1038/nrm831>

WANG Q, Zhang X, Guo YJ, Pang YY, Li JJ, Zhao YL, Wei JF, Zhu BT, Tang JX, Jiang YY, Meng J, Yue JR, Lei P. **Scopolamine causes delirium-like brain network dysfunction and reversible cognitive impairment without neuronal loss.** *Zool Res.* 2023 Jul 18;44(4):712-724. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2022.473. PMID: 37313848; PMCID: PMC10415773.

WANG, R.PH., Huang, J., Chan, K.W.Y. *et al.* **IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  play an important role in modulating the risk of periodontitis and Alzheimer's disease.** *J Neuroinflammation* 20, 71 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02747-4>

WILSON JE, Mart MF, Cunningham C, Shehabi Y, Girard TD, MacLulich AMJ, Slooter AJC, Ely EW. **Delirium.** *Nat Rev Dis Primers.* 2020 Nov 12;6(1):90. doi: 10.1038/s41572-020-00223-4. Erratum in: *Nat Rev Dis Primers.* 2020 Dec 1;6(1):94. PMID: 33184265; PMCID: PMC9012267.

WITLOX J, Eurelings LS, de Jonghe JF, Kalisvaart KJ, Eikelenboom P, van Gool WA. **Delirium in elderly patients and the risk of postdischarge mortality, institutionalization, and dementia: a meta-analysis.** *JAMA.* 2010 Jul 28;304(4):443-51.

YANG FM, Marcantonio ER, Inouye SK, Kiely DK, Rudolph JL, Fearing MA, Jones RN. **Phenomenological subtypes of delirium in older persons: patterns, prevalence, and prognosis.** *Psychosomatics.* 2009 May-Jun;50(3):248-54. doi: 10.1176/appi.psy.50.3.248. PMID: 19567764; PMCID: PMC2705885.

YOSHITAKA S, Egi M, Morimatsu H, Kanazawa T, Toda Y, Morita K. **Perioperative plasma melatonin concentration in postoperative critically ill patients: its association with delirium.** *J Crit Care.* 2013 Jun;28(3):236-42. doi: 10.1016/j.jcrc.2012.11.004. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23312124.

YU H, Li M, Zhou D, Lv D, Liao Q, Lou Z, Shen M, Wang Z, Li M, Xiao X, Zhang Y, Wang C. **Vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1)-mediated glutamate release and membrane GluA1 activation is involved in the rapid antidepressant-like effects of scopolamine in mice.** *Neuropharmacology.* 2018 Mar 15;131:209-222. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.12.028. Epub 2017 Dec 20. PMID: 29274366.

YU M, Li Y, Li B, Ge Q. **Inflammatory biomarkers and delirium: a Mendelian randomization study.** *Front Aging Neurosci.* 2023 Aug 15;15:1221272. doi: 10.3389/fnagi.2023.1221272. PMID: 37649721; PMCID: PMC10464607.

XU J, Núñez G. **The NLRP3 inflammasome: activation and regulation.** Trends Biochem Sci. 2023 Apr;48(4):331-344. doi: 10.1016/j.tibs.2022.10.002. Epub 2022 Nov 4. PMID: 36336552; PMCID: PMC10023278.

ZHAO J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, Lu D, Wei W, Wang Y, Li H, Fu Y, Zhu L. **Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice.** Sci Rep. 2019 Apr 8;9(1):5790. doi: 10.1038/s41598-019-42286-8. PMID: 30962497; PMCID: PMC6453933.

ZHAO Y, Missbrenner N, Xu HD, Josephson J. **Enhancing delirium assessment and management through nursing education interventions: A scoping review.** Nurse Educ Pract. 2024 Feb;75:103887. doi: 10.1016/j.nepr.2024.103887. Epub 2024 Jan 11. PMID: 38245939.

ZIVKOVIC AR, Sedlacek O, von Haken R, Schmidt K, Brenner T, Weigand MA, Bading H, Bengtson CP, Hofer S. **Muscarinic M1 receptors modulate endotoxemia-induced loss of synaptic plasticity.** Acta Neuropathol Commun. 2015 Nov 4;3:67. doi: 10.1186/s40478-015-0245-8. PMID: 26531194; PMCID: PMC4632469.

ZUJALOVIC B, Barth E. **Delirium Accompanied by Cholinergic Deficiency and Organ Failure in a 73-Year-Old Critically Ill Patient: Physostigmine as a Therapeutic Option.** Case Rep Crit Care. 2015;2015:793015. doi: 10.1155/2015/793015. Epub 2015 Oct 13. PMID: 26550498; PMCID: PMC4621331.

ZUSSO M, Lunardi V, Franceschini D, Pagetta A, Lo R, Stifani S, Frigo AC, Giusti P, Moro S. **Ciprofloxacin and levofloxacin attenuate microglia inflammatory response via TLR4/NF- $\kappa$ B pathway.** J Neuroinflammation. 2019 Jul 18;16(1):148. doi: 10.1186/s12974-019-1538-9. PMID: 31319868; PMCID: PMC6637517.