

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ALLAN MINATTO COLLODEL

**INIBIDOR DE RAGE PREVINE DISFUNÇÃO COGNITIVA E
REDUZ MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof.^(a). Dr.^(a) Tatiana Barichello

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C714i Collodel, Allan Minatto.

Inibidor de RAGE previne disfunção cognitiva e reduz mediadores inflamatórios em um modelo experimental de meningite pneumocócica / Allan Minatto Collodel. - 2017. 92 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: Tatiana Barichello.

1. Meningite pneumocócica. 2. Receptor de produtos finais da glicação avançada (RAGE). 3. Disfunção cognitiva. 4. Processo inflamatório. 5. Barreira hematoencefálica. I. Título.

CDD 23. ed. 616.82

Biblioteca Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

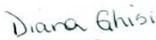
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 306

Com início às 11h30 (onze horas e trinta minutos) do dia trinta do mês de janeiro de 2018 (dois mil e dezoito), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Allan Minatto Collodel**, sob a orientação da Prof.ª Dra. Tatiana Barichello, intitulada **"INIBIDOR DE RAGE PREVINE DISFUNÇÃO COGNITIVA E REDUZ MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE MENINGITE PNEUMOCÓCICA"**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado; Prof.ª Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof.ª Dra. Fabricia Petronilho (Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 12h30 (doze horas e trinta minutos), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.ª Dra. Josiane Budni, Coordenadora Adjunta do Programa. Criciúma, 30 (trinta) de janeiro de 2018 (dois mil e dezoito).


Prof.ª Dra. Josiane Budni
Coordenadora Adjunta do PPGCS


Diana Ghisi Daniel
Secretária

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me ter dado a oportunidade da vida, aos meus pais pela educação voltada ao comprometimento com o estudo e o trabalho, assim como meus familiares e amigos que na convivência, contribuíram de alguma forma para construção de quem sou.

Agradeço imensamente à minha professora e orientadora Dra. Tatiana Barichello pela oportunidade de estar envolvido com a pesquisa em seu laboratório, e de poder tê-la como exemplo de pesquisadora e profissional.

Aos meus colegas de laboratório, agradeço especialmente à Dra. Jaqueline da Silva Generoso pelo acolhimento e orientações em todo decorrer da minha vida dentro da pesquisa. Agradecer também a Dra. Lutiana Roque Simões, Dra. Amanda Steckert, Barbara Pirola, Bruna França Lodetti, Cristiano Faller, Diogo Dominguni, Lucas, Luciano Jornada, Silvio Renato Ribeiro Junior, pela dedicação na realização dos experimentos que puderam tornar possível a realização deste trabalho.

E aos amigos que fiz durante o mestrado, Dayziane Oliveira, Henrique Tezza e Suelen Capelari que fizeram este momento muito mais divertido.

Agradeço também aos órgãos de fomento (CAPES, CNPq, FAPESC e UNESC), pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro necessário a execução dos experimentos que compõem esta tese.

RESUMO

A meningite bacteriana é uma inflamação das meninges, podendo ser ocasionada pela bactéria *Streptococcus pneumoniae* que provoca uma intensa resposta imunológica no hospedeiro. Apesar dos avanços, esta doença ainda representa uma grande taxa de mortalidade e de morbidade no mundo inteiro. Os processos inflamatórios ativados durante a meningite pneumocócica aumentam a produção de citocinas e quimiocinas provocando uma cascata de mediadores inflamatórios, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), culminando na produção aumentada (e deposição) de proteínas amiloides. O aumento da produção e deposição do peptídeo β -amiloide, proporciona locais de ligação adicionais para receptor de produtos finais da glicação avançada (RAGE) nos neurônios e microglia. A interação do receptor RAGE com seu ligante (β -amiloide, por exemplo) é capaz de estimular múltiplas vias de sinalização intracelular, incluindo a ativação e a translocação para o núcleo do fator de transcrição NF- κ B, que leva à produção de citocinas, quimiocinas, moléculas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e indiretamente o estresse oxidativo. Isso pode levar a lesões neuronais causando prejuízo de memória e aprendizagem, bem como prejuízo a integridade da Barreira Hematoencefálica (BHE). Estratégias terapêuticas sugerem que RAGE é um importante alvo para o tratamento de doenças inflamatórias, visto que a inflamação aumenta a síntese de β -amiloide e regula positivamente RAGE, e a ativação dessa via induz disfunção cognitiva em longo prazo por apoptose neuronal. Recentes estudos sugerem que a inflamação no Sistema Nervoso Central (SNC) pode desempenhar um papel fundamental para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Portanto o objetivo deste trabalho foi determinar se a ativação da via β -amiloide-RAGE está associada à disfunção cognitiva em longo prazo em sobreviventes de meningite e se a modulação da inflamação com um inibidor específico de RAGE, o FPS-ZM1 iria melhorar esses efeitos. Em modelo experimental de meningite pneumocócica, foi avaliado a produção de citocinas: Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), e Interleucina 6 (IL6); RAGE e proteína do grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1); integridade da BHE no hipocampo e no córtex pré-frontal; e também dano na memória de habituação e reconhecimento de objetos novos de ratos Wistar adultos 10 dias após o tratamento com FPS-ZM1. Nos testes a inibição do RAGE com o FPS-ZM1 preveniu a produção destas citocinas no córtex pré-frontal, diminuiu a quebra da BHE em 12,

18 e 24h tanto no hipocampo quanto no córtex, e diminuiu dano cognitivo 10 dias após a indução. Demonstrando um papel importante do RAGE na meningite causada pelo *S. pneumoniae*, tornando o FPS-ZM1 um possível tratamento adjuvante para esta doença, podendo prevenir danos neurológicos de longo prazo como apresentados na Doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Meningite. RAGE. Alzheimer.

ABSTRACT

Bacterial meningitis is an inflammation of the meninges, and can be caused by the bacterium *Streptococcus pneumoniae* that causes an intense immune response in the host. Despite the advances, this disease still represents a high mortality and morbidity rate worldwide. The inflammatory processes activated during pneumococcal meningitis increase the production of cytokines and chemokines causing a cascade of inflammatory mediators, including the production of reactive oxygen species (ROS), culminating in the increased production (and deposition) of amyloid proteins. Increased production and deposition of β -amyloid peptide provides additional receptor sites for advanced glycation products (RAGE) in neurons and microglia. The interaction of the RAGE receptor with its ligand (β -amiloide, for example) is capable of stimulating multiple intracellular signaling pathways, including activation and translocation to the nucleus of the nuclear transcription factor (NF- κ B), which leads to the production of cytokines, chemokines, proinflammatory molecules, adhesion molecules, and oxidative stress. This can lead to neuronal damage causing memory impairment and learning, as well as impairment of the integrity of the blood-brain barrier (BBB). Therapeutic strategies suggest that RAGE is an important target for the treatment of inflammatory diseases, since inflammation increases β -amiloide synthesis and regulates RAGE positively, and the activation of this pathway induces long-term cognitive dysfunction by neuronal apoptosis. Recent studies suggest that inflammation in the Central Nervous System (CNS) may play a key role in the development of neurodegenerative diseases. Therefore, the aim of this study was to determine whether activation of the B-amiloide-RAGE pathway is associated with long-term cognitive dysfunction in meningitis survivors and whether modulation of inflammation with a specific inhibition of RAGE, the N-benzyl-4-chloro-N-cyclohexylbenzamide (FPS-ZM1) would improve these effects. In an experimental model of pneumococcal meningitis, we evaluated the production of cytokines: Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β), and Interleukin 6 (IL-6); RAGE and high mobility group 1 protein (HMGB1); integrity of the BBB in the hippocampus and prefrontal cortex; and also damage in memory of habituation and recognition of novel objects of adult wistar rats 10 days after treatment with FPS-ZM1. In the tests the inhibition of RAGE with FPS-ZM1 prevented the production of these cytokines in the prefrontal cortex, decreased the BBB break in 12, 18 and 24h in both

the hippocampus and cortex, and decreased cognitive damage 10 days after induction. Demonstrating an important role of RAGE in meningitis caused by *S. pneumoniae*, making FPS-ZM1 a possible adjuvant treatment for this disease, and may prevent long-term neurological damage as presented in Alzheimer's Disease.

Keywords: Meningitis, RAGE, β -amyloid, Alzheimer

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fisiopatologia da meningite bacteriana..	30
Figura 2: Anatomia cerebral.....	34
Figura 3: Ativação do RAGE.....	39
Figura 4: Esquema ilustrativo do protocolo experimental 1.	45
Figura 5: Esquema ilustrativo do protocolo experimental 2.	46
Figura 6: Esquema ilustrativo do protocolo experimental 3.	47
Figura 7: Ilustração do procedimento de perfusão	48
Figura 8: Teste de habituação ao campo aberto.....	50
Figura 9: Teste de reconhecimento de objetos novos..	51
Figura 10: Labirinto aquático de Morris.....	52
Figura 11: Avaliação dos níveis de TNF α , IL-1 β e IL-6.....	55
Figura 12: Integridade da BHE.....	56
Figura 13: Teste de habituação ao campo aberto	57
Figura 14: Teste de reconhecimento de objetos.....	57
Figura 15: Teste labirinto aquático de Morris.....	58
Figura 16: Avaliação da expressão de RAGE, β -amilóide e HMGB1	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs: Produtos da glicação avançada (do inglês Advanced glycation endproducts);

Akt: Proteína cinase B (do inglês: Protein Kinase B);

ALZT-OP1: Combinação de cromolênio de sódio e ibuprofeno;

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

APP: Proteína percussora amiloide (do inglês Amyloid Precursor Protein);

BACE: Enzima de clivagem de β -secreção (do inglês beta-secretase enzyme);

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês Brain-derived neurotrophic factor);

BHCE: Barreira sangue-coluna-espinal (do inglês blood-spinal cord barrier);

BHE: Barreira Hematoencefálica;

BHLCR: Células endoteliais da barreira hematológica;

BRB: Barreira sangue-retina (do inglês blood-retinal barrier);

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;

Casp1: Caspase 1;

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais;

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico;

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;

COX-2: Ciclooxygenase 2;

DAMPs: Padrões moleculares associados ao dano (do inglês Damage-Associated Molecular Pattern Molecules);

DMSO: Dimetilsulfóxido;

DNA: Ácido Desoxirribonucleico (do inglês deoxyribonucleic acid);

EPM: Erro Padrão da Média;

ERKs: Extracellular signal-regulated kinases;

ERM: Espécies reativas de nitrogênio;

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio;

FAPESC: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina;

FPS-ZM1: N-benzil-4-cloro-N-ciclo-hexilbenzamida

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (do inglês Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase);

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio;

HMGB1: proteína do grupo 1 de alta mobilidade (do inglês high mobility group 1 protein);
IFN γ : Interferão gama (do inglês interferon gamma);
IL-1 β : Interleucina 1 β ;
IL-6: Interleucina 6;
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível (do inglês nitric oxide synthase);
IRAK4: Receptor Associado a Kinase 4 (do inglês Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4);
LCR: Líquido Cefalorraquidiano
LPS: Lipopolissacarídeo;
LTA: Ácido lipoteicoide (do inglês Lipoteichoic acid);
Mac1: Antígeno de macrófagos β -integrina 1;
MMP-2: Matrix metalloproteinase 2;
MMP-9: Matrix metalloproteinase 9;
MRP14: Proteína 14 relacionada com mielóides (do inglês Migration Inhibitory Factor-related Protein 14);
MYD88: Proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (do inglês Myeloid differentiation primary response 88);
N. meningitidis: Neisseria Meningitidis;
NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate);
NF- κ B: fator nuclear kappa B;
NLRs: Nod-likes;
NLRP3: Receptore do tipo NOD contendo domínio de pirina 3
NO: Óxido nítrico (do inglês nitric oxide);
NOX: NADPH oxidase;
O $_2^{\bullet-}$: Radical ânion superóxido;
ONOO: Peroxinitrito;
PAFR: Receptor de fator ativador de plaquetas (do inglês Platelet Activating Factor Receptor);
PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês Pathogen-Associated Molecular Pattern);
PCho: Fosforilcolina (do inglês Phosphocholine);
PECAM-1: Moléculas de adesão de células endoteliais plaquetárias 1 (do inglês Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule);
pIgR: Receptor polimérico de imunoglobina (do inglês Polymeric immunoglobulin receptor);
Ply: Pneumolisina;
PMNs: Leucócitos polimorfonucleares (do inglês Polymorphonuclear leukocytes);

PRR: Receptores de reconhecimento padrão (do inglês Pattern Recognition Receptors);
PspA: Proteína de superfície pneumocócica A (do inglês Pneumococcal Surface Protein A);
PspC: Proteína de superfície pneumocócica C (do inglês Pneumococcal Surface Protein C);
RAGE: Receptor de produtos finais da glicação avançada (do inglês receptor sites for advanced glycation end products);
S100 β : Subunidade β da proteína ligante de cálcio S100;
SDS-PAGE: Dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (do inglês Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis);
SFKs: Kinases da família Src;
SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação;
SNC: Sistema Nervoso Central;
SPSS: Statistical Package for the Social Science;
TGF β : Fator transformador de crescimento β (do inglês transforming growth factor beta);
TLR: Receptor tipo Toll (do inglês: Toll-like Receptor);
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α (do inglês Tumor Necrosis Factor α);
UFCol/mL: Unidades formadas de colônias por mililitro.
UNESC: Universidade do Extremo Sul Catarinense;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	MENINGITE BACTERIANA	23
1.2	EPIDEMIOLOGIA	24
1.3	FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE PNEUMOCÓCICA	26
1.4	CITOCINAS	31
1.5	BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA.....	33
1.6	RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA.....	36
1.7	JUSTIFICATIVA.....	40
2	OBJETIVOS	42
2.1	OBJETIVO GERAL	42
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA	43
3.2	CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	43
3.3	CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA.....	43
3.4	PREPARAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO INFECTANTE	44
3.5	MODELO ANIMAL DE MENINGITE	44
3.6	DESENHO EXPERIMENTAL.....	44
3.7	TRATAMENTO	47
3.8	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF- α , IL-1 β E IL-6	47
3.9	INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA POR AZUL DE EVANS	48
3.10	ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING	49
3.11	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	50
3.11.1	Habituação ao campo aberto	50
3.11.2	Memória de reconhecimento de objetos	50
3.11.3	Labirinto aquático de Morris	51
3.12	DESCARTE DAS COBAIAS.....	52
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
4	RESULTADOS	54
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 MENINGITE BACTERIANA

A meningite bacteriana é uma inflamação das meninges e do espaço subaracnóideo que também pode envolver o córtex e o parênquima cerebral, devido a uma estreita relação anatômica entre o líquido cefalorraquidiano (LCR) e o cérebro (Costerus et al., 2017). Essa inflamação é primariamente induzida por invasão de bactérias no sistema nervoso central (SNC), especificamente no LCR, ventrículo e espaço subaracnóideo (Liechti et al., 2015), sendo causada, em parte, pelo agente infeccioso e, em parte, pela resposta imune do hospedeiro (Roos e Van De Beek, 2010). O envolvimento do córtex e parênquima cerebral, por causa da inflamação ou complicações vasculares, pode resultar em alterações comportamentais (Van De Beek et al., 2004) e prejuízos neurológicos (Koedel et al., 2002; Bellac et al., 2010).

Os patógenos podem infectar o SNC durante uma bacteremia ou mais frequentemente acessando estruturas adjacentes durante um processo inflamatório como por exemplo em sinusites ou otites (Liechti et al., 2015). A inflamação das meninges e do espaço subaracnóideo leva à tríade clássica de sintomas de meningite: dor de cabeça, febre e rigidez cervical e também o aumento da contagem de leucócitos no LCR (Costerus et al., 2017).

Os principais agentes etiológicos da meningite bacteriana são *Neisseria meningitidis* (38%), *Streptococcus pneumoniae* (16%) e *Haemophilus influenzae* tipo b (55%) dependendo da faixa etária (Brasil, 2013).

A bactéria Gram-positiva *S. pneumoniae* é um importante

residente comensal da nasofaringe humana e é a principal causa etiológica de meningite bacteriana, responsável por dois terços dos casos de meningite na Europa e nos EUA (Brouwer et al., 2010). Embora a colonização seja geralmente assintomática, o *S. pneumoniae* pode se tornar invasivo e se espalhar do trato respiratório superior para outros órgãos, levando a doenças graves como pneumonia, sepse ou meningite (Henriques-Normark e Tuomanen, 2013).

Apesar da implementação de vários programas de vacinação e agentes antimicrobianos, a meningite bacteriana ainda é uma doença com alta morbidade e mortalidade (Mcintyre et al., 2012). Além disso, sequelas neurológicas são relativamente comuns nos sobreviventes de meningite bacteriana, fazendo com que aproximadamente 50% dos pacientes sofram com déficit sensorio motor, convulsões, prejuízos no aprendizado e na memória, déficit de atenção, lentidão de resposta auditiva e cegueira (Van De Beek et al., 2002; Mook-Kanamori et al., 2011), sendo evidenciada associação, inclusive, com doenças psiquiátricas como esquizofrenia (Abraham et al., 2005).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

A meningite bacteriana está associada a alta mortalidade e morbidade em todo o mundo. Estimativas mostram cerca de 171.000 mortes por meningite no mundo a cada ano (Ceyhan et al., 2008). Em 2013, houve aproximadamente 16 milhões de casos, deixando 1,6 milhão de sobreviventes com algum tipo de sequela (Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013,

2015).

As taxas de incidência de meningite em países de alta renda (como Europa, Estados Unidos e Austrália) são de 0,8 - 2,6 a cada 100.000 adultos por ano e pode ser até 10 vezes maior nos países em desenvolvimento (Engelen-Lee et al., 2016).

As causas mais comuns de meningite bacteriana são *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*, com prevalência variável dependendo da faixa etária e região (Brouwer et al., 2010; Thigpen et al., 2011). No Brasil, foram relatados 7.392 casos de meningite pneumocócica entre 2010 e 2016, com uma letalidade em média de 29%. Esses valores ainda podem ser maiores pois há mais de 21 mil casos de meningite não especificada neste mesmo período (SINAN, 2017). Apesar de maior incidência, as taxas de letalidade para meningite meningocócica são mais baixas, entre 3 e 10% em todo o mundo (Lucas et al., 2016). No Brasil, entre 2010 e 2016 foram 14.532 casos de meningite meningocócica (SINAN, 2017). A incidência da meningite bacteriana está mudando conforme as medidas de prevenção se tornam cada vez mais utilizadas (Mcintyre et al., 2012).

As vacinas conjugadas usadas na maioria dos países de alta renda e cada vez mais em países em desenvolvimento, reduziram as taxas de meningite pneumocócica não apenas em crianças e jovens vacinados, mas também entre grupos etários que não recebem a vacina, pela redução da transmissão dessas bactérias (Hsu et al., 2009; Costerus et al., 2017). O Brasil teve 1.163 casos notificados de meningite pneumocócica em 2010, baixando gradativamente para 881 casos notificados em 2016 (SINAN, 2017), sendo que na década de 1990, a

média de casos de meningite era de 28.000 (Epidemiologia, 2005).

Já no cinturão africano da meningite, a taxa de incidência anual é de até 58 casos por 100.000 habitantes numa população com menos de 6 meses de vida, 15 casos por 100.000 entre 15 e 19 anos e 9 casos por 100.000 habitantes no restante da população (Mueller et al., 2012).

As taxas de letalidade variam com a idade do paciente, patógeno causador e renda do país (Lucas et al., 2016). A meningite causada por *S. pneumoniae* tem as maiores taxas de letalidade: 20-37% em países de alta renda e acima de 51% em países de baixa renda (Brouwer et al., 2010) e até 30% dos sobreviventes desenvolvem sequelas neurológicas de longo prazo, como: dificuldades cognitivas (6,3%), convulsões (3,7%), perda auditiva (11,2%), déficits motores (8,7%) e problemas comportamentais (6,8%) (Edmond et al., 2010). Estas sequelas podem persistir por muitos anos e são particularmente importantes para as crianças, considerando o seu desenvolvimento intelectual e comportamental (Grimwood et al., 2000; Grandgirard e Leib, 2010). Uma meta-análise mostrou que o risco de sequelas após a meningite bacteriana é diferente em países de alta e baixa renda e que mais pacientes apresentaram sequelas na África (25,1%) e Sudeste Asiático (21,6%), em comparação com a Europa (9,4%) (Edmond et al., 2010).

1.3 FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE PNEUMOCÓCICA

Um importante fator para o desenvolvimento da meningite bacteriana é a adesão e a colonização da nasofaringe pelo micro-organismo infectante (Koedel et al., 2002). A bactéria *S. pneumoniae* é um importante residente comensal da nasofaringe humana (Iovino et al., 2016).

Um de seus mecanismos de virulência é a expressão de uma cápsula que reduz o seu aprisionamento no muco, permitindo assim que o pneumococo acesse as superfícies epiteliais (Nelson et al., 2007), promove a colonização, dificulta a fagocitose e a ativação do sistema de complemento, importante para evitar a bacteremia após a colonização da mucosa (Bogaert et al., 2004). O hospedeiro é incapaz de erradicar o micro-organismo, que é capaz de invadir a mucosa e alcançar a circulação sanguínea (Somand e Meurer, 2009), sendo essa a principal rota para que as bactérias alcancem as meninges (Mook-Kanamori et al., 2011).

Os mecanismos exatos pelos quais as infecções bacterianas ocorram em alguns indivíduos, e não em outros, não são claros, mas parecem depender de uma interação complexa entre fatores ambientais (infecções prévias, tabagismo, abuso de álcool) e fatores genéticos do hospedeiro (Bogaert et al., 2004; Brouwer et al., 2009). Além disso, variações genéticas têm sido recentemente associadas com predisposição em indivíduo a doenças pneumocócicas como por exemplo: um dano na codificação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) ou deficiência no receptor associado a cinase 4 (IRAK4) assim como a proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MYD88) e também doença meningocócica que pode causar um polimorfismo nos genes de receptores de reconhecimento padrão (PRR) como o receptor Toll-like 9 (TLR9) (Van De Beek et al., 2004; Brouwer et al., 2009; Kloek et al., 2016).

Ao atingir a corrente sanguínea, as bactérias terão que suportar um ambiente bactericida, e a cápsula de polissacarídeo serve de escudo contra sua opsonização (Koedel et al., 2010). E ainda, as proteínas de

superfície pneumocócicas PspA e PspC e a toxina pneumolisina estão envolvidas na inibição da ativação do complemento e morte bacteriana (Costerus et al., 2017).

A invasão bacteriana no SNC pode ocorrer tanto após disseminação da bactéria pela corrente sanguínea ou por extensão de uma sinusite ou otite. A infecção do SNC também é possível através de uma má formação na dura-máter, após neurocirurgia ou trauma crânio-cervical (Sellner, J. et al., 2010).

São necessários níveis elevados de bactérias durante um período prolongado de bacteremia para favorecer a penetração do *S. pneumoniae* no espaço subaracnóideo, aumentando diretamente a probabilidade das bactérias interagirem com as células endoteliais da barreira hematólica (BHL) (Costerus et al., 2017). Aparentemente esse processo se dá em veias e vênulas pós capilares dentro do espaço subaracnóideo e perivasculares devido à grande proximidade com o LCR (Iovino, et al., 2013).

A adesão inicial parece ser mediada pela ligação da PspA aos receptores de laminina expressos em células endoteliais do cérebro (Orihuela et al., 2009). O que promove aumento do receptor de fator ativador de plaquetas (PAFR) na superfície endotelial, ligando-se a fosforilcolina (PCho) da superfície do *S. pneumoniae* permitindo-lhe atravessar da corrente sanguínea para o LCR (Martin-Moreno et al., 2011).

Este patógeno atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) sem evidência de dano ou detecção do micro-organismo entre as células (Kim, 2008). Uma vez alcançado o LCR, a bactéria multiplica-se

rapidamente, pois os níveis de complemento são inferiores aos do sangue, disseminando-se sobre toda a superfície do cérebro. Com o aumento da densidade bacteriana, elas começam a morrer em resposta a várias condições de estresse, privação de nutrientes e tratamento com antibióticos (Chiavolini et al., 2008) o que leva a uma rápida lise bacteriana com liberação de componentes bacterianos como o ácido teicóico, peptidoglicano, DNA e fragmentos da parede celular (Koedel et al., 2010; Sellner, J. et al., 2010; Mook-Kanamori et al., 2011).

Estes componentes são conhecidos como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), que são reconhecidos por PRRs, componentes fundamentais que induzem a resposta imune inata. A ativação de TLRs e receptores Nod-likes (NLRs) que são PRRs, leva à ativação de fatores de transcrição inflamatórios, em particular o NF- κ B (Sellner, et al., 2010; Mook-Kanamori et al., 2011; Costerus et al., 2017), levando a uma grande liberação de moléculas pró-inflamatórias como citocinas e quimiocinas além de proteínas do complemento que irão realizar ações que visam a proteção (Koedel et al., 2002; Costerus et al., 2017) (Figura 1).

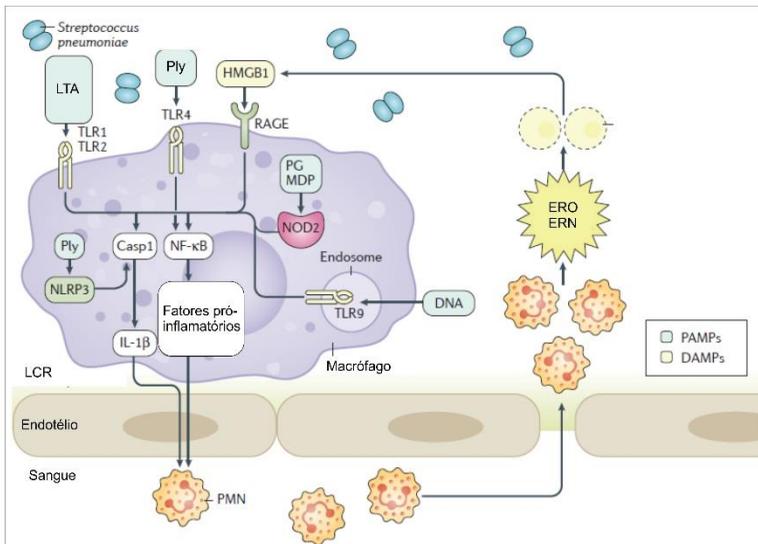


Figura 1: Fisiopatologia da meningite bacteriana. Os padrões moleculares associados aos patógenos de (PAMPs) podem ativar células imunes dentro do líquido cefalorraquidiano (LCR) através de receptores Toll-likes (TLR1 / 2), TLR4 e TLR9, bem como receptores Nod-likes (NOD), NOD2, e contendo domínio de pirina 3 (NLRP3). O ácido lipoteicoide (LTA), a pneumolisina (Ply) e o DNA são reconhecidos por TLR1 / 2, TLR4 e TLR9, respectivamente. Essas interações resultam na ativação da enzima caspase 1 (Casp1), que catalisa a conversão da pró-forma de citocinas da família IL-1 na molécula ativa e de fatores de transcrição, como fator nuclear- κ B (NF- κ B), que por sua vez regula a produção de diversos fatores pró-inflamatórios, consequentemente, um grande número de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) são recrutados. Essas células infiltrantes podem liberar numerosos produtos citotóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) que podem causar morte celular necrótica. As células bacterianas danificadas podem liberar sinais de alarme (os chamados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), incluindo a proteína 14 relacionada com mieloides (MRP14) e a caixa de grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1), que pode alimentar a inflamação interagindo com receptores, como TLR4 e receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE). Adaptado de Costerus et al., 2017.

Em resposta a isso, leucócitos polimorfonucleares migram da corrente sanguínea até o local da infecção, produzindo óxido nítrico (NO), radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio

(H₂O₂). O₂^{•-} e NO podem conduzir à formação de peroxinitrito (ONOO), sendo este um forte oxidante (Klein et al., 2006). Este oxidante exerce efeitos citotóxicos sobre as células endoteliais (Szabo, 2003), aumenta a permeabilidade da BHE, induz a peroxidação lipídica e gera outras interações complexas que estão envolvidas na fisiopatologia da meningite pneumocócica (Klein et al., 2006). Estas alterações inflamatórias contribuem significativamente para a lesão do SNC comumente associada com a meningite bacteriana (Polfliet et al., 2001).

1.4 CITOCINAS

As citocinas são polipeptídios ou glicoproteínas hidrossolúveis produzidas por diversos tipos de células. São formadas durante uma lesão, por células do local lesionado ou por células do sistema imunológico (Lin et al., 2000). Diferentes citocinas podem ser produzidas para uma ação semelhante, normalmente em cascata, ou seja, uma citocina leva a produção de outra (Zhang e An, 2007). As citocinas se ligam a receptores específicos, ativando uma cascata intracelular promovendo a transcrição de genes, podendo ativar ou regular a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como: interleucina (IL) 1, 2, 6, 7 e fator de necrose tumoral (TNF) ou anti-inflamatórias como: IL-4, 10, 13 e fator transformador de crescimento β (TGF β) (Curfs et al., 1997).

As citocinas são mediadores necessários a inflamação, mas uma expressão exacerbada, pode causar efeitos danosos a plasticidade neuronal, danos comportamentais e cognitivos (Hu et al., 2014a). Após

colonização da nasofaringe e passagem pela BHE, o *S. pneumoniae* é reconhecido por células apresentadoras de antígenos através da ligação aos receptores Toll-like. O que induz a ativação do NF- κ B levando a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Barichello et al., 2013).

Os astrócitos, células gliais, células endoteliais, células endimais e macrófagos residentes no cérebro podem produzir citocinas e moléculas pró-inflamatórias em resposta a replicação e componentes bacterianos (Moreillon e Majcherczyk, 2003). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória ajudando na eliminação do patógeno além de regular a expressão de outros mediadores pró-inflamatórios (Ichiyama et al., 2002). A IL-1 β é encontrada em LCR de pacientes com meningite bacteriana, e controla a expressão de outras citocinas como TNF- α , IL-6, interferon (IFN)- γ e quimiocinas (Ostergaard et al., 2004).

A IL-6 é produzida por monócitos, células endoteliais e astrócitos primários em resposta a IL-1 β (Rusconi et al., 1991), por vezes com uma ação anti-inflamatória, podendo até mesmo diminuir a permeabilidade da BHE na meningite bacteriana (Paul et al., 2003). A IL-10 é um potente citocina imunossupressora sendo produzida por monócitos, macrófagos, linfócitos B e T, células cerebrais como neurônios e micróglia (Howard e O'garra, 1992) que pode inibir a produção de TNF- α e IL-6 e ainda diminuir espécies reativas de oxigênio (Koedel et al., 1996). O TGF- β também é uma citocina anti-inflamatória inibindo a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α na microglia (Suzumura et al., 1993).

1.5 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

A BHE é um sistema vascular especializado que separa o cérebro do sangue e tem a função de proteger e suprir de nutrientes as células do cérebro (Abbott et al., 2010). A permeabilidade da barreira é muito restrita, de modo que apenas água, gases como oxigênio e dióxido de carbono e determinadas moléculas lipossolúveis muito pequenas atravessam ela de forma íntegra (Banks, 2010). É formada pela presença de junções entre as células endoteliais proporcionando uma camada que reveste a superfície interior dos vasos sanguíneos e que controlam a abertura e fechamento coordenado das junções célula-célula (Munzel et al., 2008; Stamatovic et al., 2008). Estas junções são compostas de diferentes complexos multi-proteicos, como as junções apertadas e as junções endoteliais aderentes que são os principais reguladores da permeabilidade celular (Bazzoni e Dejana, 2004).

A BHE controla e regula a homeostase do cérebro, medula espinhal e LCR com o restante dos sistemas. Dentre as barreiras, podemos ter especializações como: BHE, BHLCR, barreira sangue-retina (BRB), barreira sangue-coluna-espinhal (BHCE), barreira sangue-labirinto e barreira sangue-nervo (Edelhauser et al., 2015).

Os patógenos só podem invadir o cérebro depois de atravessar a camada de células endoteliais da BHE, portanto, devem desenvolver estratégias para ultrapassar essa barreira (Figura 2) (Iovino et al., 2016).

A sobrevivência de agentes patogênicos na corrente sanguínea e infecções nas proximidades do cérebro permite uma possível invasão do SNC, o que pode levar a inflamação das meninges, pleocitose no LCR, infiltração no tecido nervoso e aumento da permeabilidade da BHE

(Doran et al., 2016).

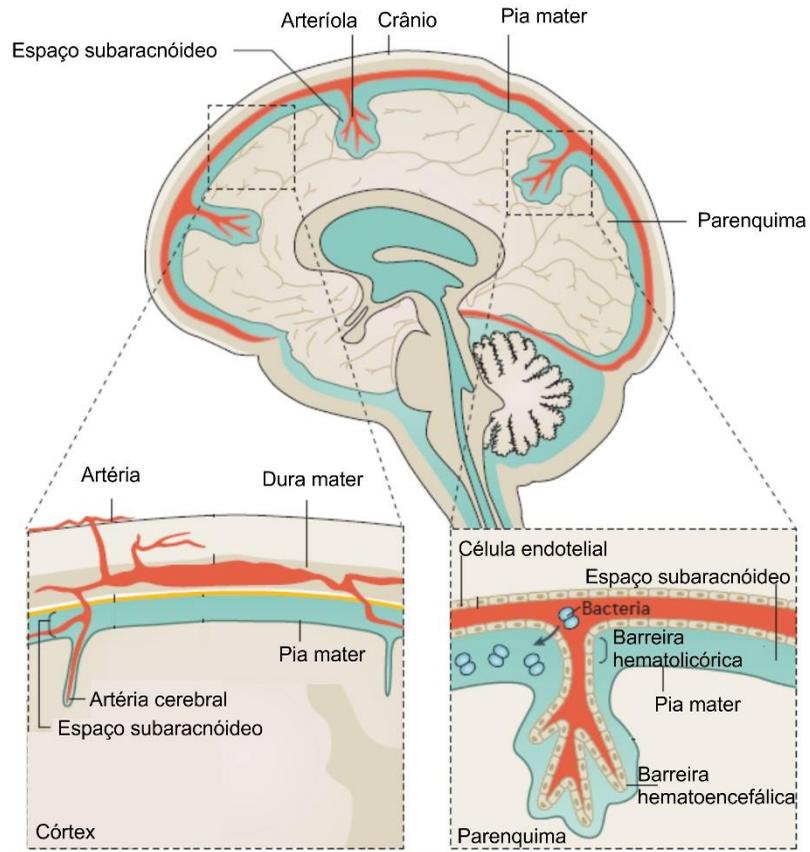


Figura 2: Anatomia cerebral, mostrando as meninges e o líquido cefalorraquidiano (LCR) estão em estreita relação anatómica com o córtex cerebral e o parênquima cerebral. Adaptada de Costerus et al., 2017.

O mecanismo pelo qual o *S. pneumoniae* atravessa a BHE é mediado por receptores que promovem a transcitose do patógeno através das camadas de células endoteliais e epiteliais (Iovino et al., 2016). Um receptor que promove a invasão através das células endoteliais é o PAFR (Iovino, Brouwer, et al., 2013). A presença do receptor

polimérico de imunoglobina (pIgR) nas células endoteliais do cérebro, mostra um possível envolvimento deste receptor na adesão e invasão do *S. pneumoniae* (Iovino et al., 2014b). Análises de imunofluorescência mostraram a maioria dos pneumococos interagindo com o pIgR sugerindo uma adesão direta entre eles na BHE (Iovino et al., 2014b).

Tem sido proposto que a ativação de PAFR pode causar uma regulação positiva do pIgR em células endoteliais. Os dois receptores facilitam em conjunto a passagem do *S. pneumoniae* através da BHLCR (Costerus et al., 2017). Um estudo recente sugere que o PAFR desempenha um papel na adesão, mesmo que os pneumococos não se liguem diretamente a ele (Iovino et al., 2014b; Iovino et al., 2016). Outro fator envolvido na translocação de bactérias é o receptor de laminina (RL) que interage com o pneumococo facilitando a passagem através do endotélio da BHE (Orihuela et al., 2009). Ainda, alguns estudos sugerem o envolvimento de moléculas de adesão de células endoteliais plaquetárias 1 (PECAM-1) na adesão do *S. pneumoniae* ao endotélio vascular cerebral (Iovino et al., 2014a). Porém, ainda não está claro o papel exato de PAFR, pIgR, RL e PECAM-1 e suas interações na adesão do *S. pneumoniae* às células endoteliais.

Uma vez que o patógeno atinge o LCR, é provável que sobreviva, pois, as defesas do hospedeiro no espaço subaracnóideo parecem ser ineficazes contra as bactérias encapsuladas. Esse déficit imune pode ser devido à virtual ausência de PRR solúveis, como as proteínas do complemento, que se ligam à superfície dos patógenos e os marcam para a fagocitose (Koedel et al., 2002).

1.6 RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA

A meningite bacteriana induz uma resposta inflamatória que lesiona o tecido neuronal causando prejuízos de aprendizagem e de memória (Irazuzta et al., 2005). Diversos estudos sugerem que a inflamação no SNC pode desempenhar um papel fundamental para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Rivest, 2009; Allison e Ditor, 2014; Chen et al., 2016).

A doença de Alzheimer, uma doença neurodegenerativa que afeta a memória e o comportamento (Ballard et al., 2011) está entre as demências mais comuns no mundo, caracterizada pela presença do peptídeo β -amiloide, formado pela clivagem da proteína precursora amiloide (APP) e emaranhados neurofibrilares, formados pela hiperfosforilação da Tau (Cox et al., 2016; Ji et al., 2016).

A fisiopatologia dessa doença é caracterizada pela intensa perda neuronal, que resulta na diminuição das sinapses e conseqüentemente morte celular, estresse oxidativo e uma exacerbada resposta inflamatória, levando ao declínio progressivo na capacidade cognitiva e funcional tornando-a uma das principais causas de incapacidade entre os idosos e acredita-se que o número de pessoas afetadas por essa doença deverá aumentar nos próximos anos (Brookmeyer et al., 2007; Li et al., 2011). Estudos têm tentado desvendar os mecanismos exatos subjacentes à doença de Alzheimer e novas evidências sugerem que a neuroinflamação pode exacerbar o risco ou mesmo causar a doença de Alzheimer por compartilhar mecanismos semelhantes de cascatas inflamatórias (Su et al., 2016).

A deposição excessiva de β -amiloide no tecido cerebral ativa o

NF- κ B e induz a secreção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a ciclooxigenase 2 (COX-2) pela micróglia (Kang et al., 2001; Martin-Moreno et al., 2011). O peptídeo β -amiloide também é capaz de desencadear a ativação do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), o qual medeia uma série de eventos, incluindo a inflamação e dano oxidativo (Fang et al., 2010; Carrano et al., 2011).

O RAGE é uma proteína transmembrana que reconhece moléculas tridimensionais, promovendo interação com diversos ligantes (Deane et al., 2012). Adicionalmente, o RAGE representa um fator importante na imunidade inata contra agentes patogênicos, mas também interage com ligantes endógenos, resultando na inflamação crônica (Fang et al., 2010; Zong et al., 2010). Além de produtos da glicação avançada (AGEs), o RAGE tem outros ligantes importantes, tais como proteína do grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1), subunidade β da proteína ligante de cálcio S100 (S100 β), peptídeos β -amiloide, entre outros (Takuma et al., 2009; Carrano et al., 2011).

A interação de RAGE com seu ligante (β -amiloide, por exemplo) é capaz de estimular múltiplas vias de sinalização intracelular, incluindo a ativação e a translocação para o núcleo do fator de transcrição NF- κ B, que leva à produção de citocinas, quimiocinas, moléculas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e estresse oxidativo, causando inflamação (Fang et al., 2010; Deane et al., 2012). Além disso, verificou-se sua relação com uma variedade de lesões no SNC, como disfunção neuronal, amplificação da neuroinflamação e aumento do influxo de β -amiloide pela BHE (Takuma et al., 2009; Fang et al., 2010; Carrano et al., 2011; Deane et al., 2012).

A estimulação da micróglia por oligômeros de β -amiloide pode ser semelhante à ativação por componentes bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS) (Heneka et al., 2015). A micróglia é o principal componente celular do sistema imune inato do SNC envolvida na modulação de processos imunes e inflamatórios. Na meningite pneumocócica, a ativação da microglia pode acontecer por diversos estímulos que em conjunto estão envolvidos na eliminação do micro-organismo invasor (Barichello et al., 2013; Hu et al., 2014b). A ativação da micróglia ocorre inclusive em processos neurodegenerativos crônicos como a doença de Alzheimer (Salminen et al., 2009).

Níveis elevados de β -amiloide podem aumentar a expressão de RAGE. Estudos apontam que os peptídeos β -amiloides podem causar toxicidade direta a neurônios e ativar inflamação via micróglia, induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias com efeitos citotóxicos. Inicialmente as células da micróglia conseguem degradar o peptídeo β -amiloide, porém com o acúmulo do mesmo há um esgotamento destas células, gerando lesões neuronais e possíveis déficits cognitivos (Cox et al., 2016).

A ativação de RAGE por seu ligante é capaz de gerar um feedback positivo entre RAGE e NF- κ B, gerando um ciclo vicioso entre estresse oxidativo e inflamação, que cursaria o aumento de β -amiloide e consequente ativação de NF- κ B, e então, aumento da expressão de RAGE. Por sua vez, o RAGE aumentado interage com seus ligantes, induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e ativa NF- κ B novamente (Carrano et al., 2011; Zhang et al., 2013) (Figura 3). Adicionalmente, a ativação de RAGE pode ser feita por HMGB1, que está aumentado nos fluidos extracelulares em doenças inflamatórias,

bem como por S100 β , uma proteína relevante na disfunção do SNC (Sims et al., 2010).

Dados da literatura indicam que uma diminuição na atividade de α -secretase e um aumento na atividade de β e γ -secretase podem induzir a deposição cerebral de β -amiloide (Gonzalez-Burgos et al., 2011; Waites e Garner, 2011). Outro fator importante é que a toxicidade de β -amiloide parece ser dependente do estado metabólico do organismo, visto que ocorre uma disfunção mitocondrial em doenças infecciosas (Figura 3) (Wuwongse et al., 2013).

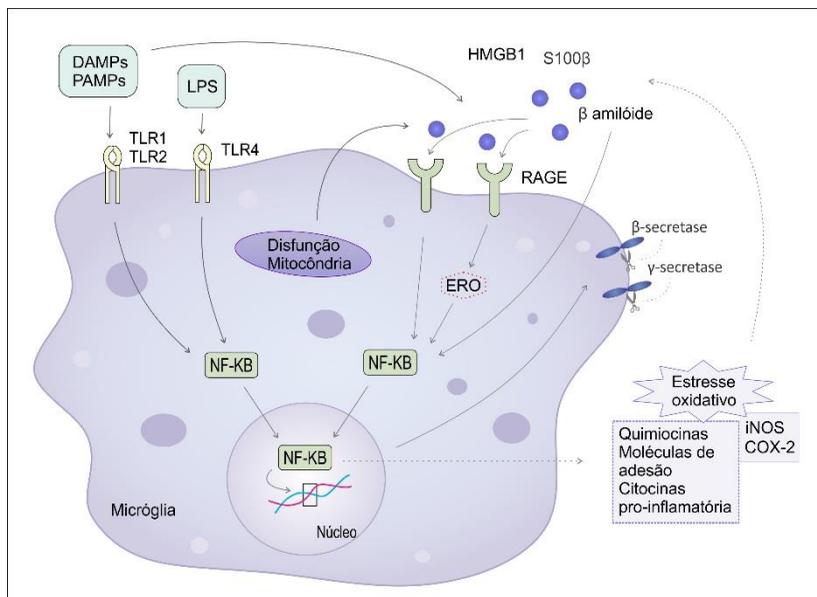


Figura 3: Ativação do RAGE através de DAMPs e PAMPs e produção de β -amiloide na fisiopatologia da meningite bacteriana. O RAGE reconhece proteína do grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1), subunidade β da proteína ligante de cálcio S100 (S100 β), peptídeos β -amiloide, que ativa NF- κ B levando a produção de citocinas, quimiocinas, moléculas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e estresse oxidativo. Componentes bacterianos como lipopolissacarídeos (LPS) também pode aumentar a

produção de β -amiloide, bem como um aumento na atividade de β e γ -secretase. Figura elaborada pelo autor, 2017.

O bloqueio da sinalização de RAGE utilizando anticorpos RAGE tem sido previamente feito em modelos de inflamação e sepse e observou-se que sua inibição teve um impacto significativo na sepse, principalmente por meio de atenuação de sinalização pró-inflamatória (Van Zoelen et al., 2009). Estratégias terapêuticas sugerem que RAGE é um importante alvo para o tratamento de doenças inflamatórias, visto que a inflamação aumenta a síntese de β -amilóide e regula positivamente RAGE, e a ativação dessa via induz disfunção cognitiva em longo prazo por apoptose neuronal. Além disso, a toxicidade de β -amilóide induz ainda mais disfunção mitocondrial nesse processo (Gong et al., 2010; Han et al., 2011).

1.7 JUSTIFICATIVA

Atualmente, apesar dos avanços na medicina, um grande número de pacientes, que sobrevivem à meningite pneumocócica, apresenta sequelas comportamentais, perda de audição, convulsões, déficits neurológicos, prejuízo de aprendizagem e perda de memória. No entanto, os mecanismos biológicos envolvidos no processo inflamatório dos pacientes acometidos por esta doença ainda não são totalmente elucidados. Portanto, desenvolver estudos que esclareçam a fisiopatologia da meningite bacteriana é de suma importância, bem como a identificação de possíveis alvos terapêuticos e terapias adjuvantes que possam amenizar os danos neurológicos causado aos pacientes. Estudos mostram um papel importante da via β -amiloide/RAGE na exacerbação da resposta inflamatória dentro do SNC

e que a inibição específica do RAGE pode diminuir essa inflamação. Desde modo, o uso de anti-RAGE poderia diminuir a resposta imune do hospedeiro prevenindo danos cognitivos ocasionados pela meningite pneumocócica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso de anti-RAGE como terapia adjuvante sobre a resposta inflamatória e dano cognitivo em ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Avaliar os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos em 24 horas após a indução da meningite pneumocócica tratados ou não com anti-RAGE.

-Avaliar a integridade da BHE em 12, 18 e 24 horas em hipocampo e córtex cerebral de ratos Wistar adultos após a indução da meningite pneumocócica tratados ou não com anti-RAGE.

-Avaliar os níveis de deposição β -amiloide, expressão do receptor RAGE e HMGB1 no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos em 10 dias após a indução de meningite pelo *S. pneumoniae* tratados ou não com anti-RAGE.

-Avaliar os parâmetros comportamentais através da verificação da memória de habituação, memória de reconhecimento de objetos novos e labirinto aquático de Morris em ratos Wistar adultos 10 dias após a indução de meningite pneumocócica tratados ou não com inibidor RAGE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Experimental, Laboratório de Neurociências, Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil e The University of Texas (UTHealth), Houston, TEXAS, USA. O estudo foi realizado dentro das diretrizes estabelecidas pelo Animal Welfare Committee da UTHealth e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais.

Este projeto tem aprovação pela Animal Welfare Committee, UTHealth, com o protocolo AWC-16-0106 (Anexo A) e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESC (Protocolo 021/2015-2) (Anexo B). Sendo assim, todos os cuidados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos serão adotados.

3.2 CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Para este estudo, foram utilizados ratos Wistar machos, adultos com 60 dias de vida, saudáveis, pesando entre 250 e 300 g e que não tenham sido utilizados em estudos anteriores, procedentes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Eles foram acondicionados em caixas de no máximo cinco animais, com comida e água ad libitum, mantidos em ambiente com temperatura de 23 °C +/- 1 °C e umidade relativa entre 55 e 65%, num ciclo de 12 horas claro-escuro (7h às 19h).

Foram excluídos do estudo os animais que apresentaram qualquer má-formação aparente; peso inferior a 250 g ou superior a 350 g; animais que já foram usados em experimentos anteriores; animais que eventualmente morrerem durante o experimento, antecedendo o tempo de eutanásia pré-estabelecido.

3.3 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Com base em estudos prévios em pacientes e estudos em modelos animais, para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias calculou-se um tamanho de amostra de 6 animais por grupo

para os testes imunquímicos e 10 animais por grupo para os testes comportamentais, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%.

3.4 PREPARAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO INFECTANTE

O *S. pneumoniae*, sorotipo III, proveniente do Instituto Adolfo Lutz, foi cultivado durante a noite em 10 mL de caldo Todd Hewitt, diluído em meio fresco e crescido até a fase logarítmica. No dia do experimento, a cultura foi centrifugada durante 10 min a 5000 x g e novamente suspensa em solução salina estéril até a concentração de 5×10^9 UFCol/mL (Grandgirard, Steiner, et al., 2007).

3.5 MODELO ANIMAL DE MENINGITE

Todos os procedimentos de manipulação do modelo experimental de meningite bacteriana foram realizados sob anestesia, composta de uma administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina (6,6 mg/kg) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg) (Grandgirard, Schurch, et al., 2007; Hoogman et al., 2007).

Para indução da meningite bacteriana, os animais foram devidamente anestesiados e posicionados no estereotáxico onde foram submetidos a uma punção na cisterna magna com uma agulha calibre 23, recebendo 10 μ L de solução salina estéril como placebo para o grupo controle ou volume equivalente de suspensão bacteriana de *S. pneumoniae* para o grupo experimental. Logo após a inoculação, os animais receberam reposição volêmica (subcutânea) e foram devolvidos às suas respectivas gaiolas (Irazuzta et al., 2002; Irazuzta et al., 2008). A meningite foi documentada a partir de uma cultura quantitativa de 5 μ L de LCR obtidos por punção da cisterna magna (Barichello, et al., 2010a). Dezoito horas após a indução da meningite, os animais destinados aos testes comportamentais receberam tratamento com antimicrobiano (100 mg/kg de ceftriaxona) a cada 12 horas durante 7 dias.

3.6 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram realizados 3 (três) protocolos experimentais.

Protocolo 1: para avaliação dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em 24 horas após a indução os animais foram divididos em 4 grupos: controle/salina (n = 6), controle/anti-RAGE (n = 6), meningite/salina (n

= 6) e meningite/anti-RAGE (n = 6). Totalizando 24 animais, que foram tratados com salina ou anti-RAGE (1,5 mg/kg).

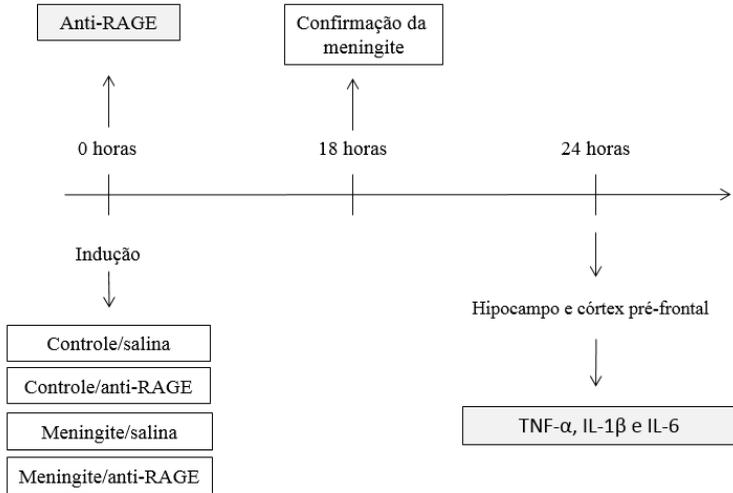


Figura 4:Esquema ilustrativo do protocolo experimental 1. Figura elaborada pelo autor, 2017.

Protocolo 2: para a avaliação da integridade da BHE em 12, 18 e 24 horas após a indução os animais foram divididos em 4 grupos: controle/salina (n = 6), controle/anti-RAGE (n = 6), meningite/salina (n = 6) e meningite/anti-RAGE (n = 6), tendo a BHE 3 horários diferentes de morte e considerando que cada horário teve 4 grupos o total foi de 72 animais, que foram tratados com salina ou anti-RAGE (1,5 mg/kg), conforme grupo experimental, uma dose única intraperitoneal no momento da indução.

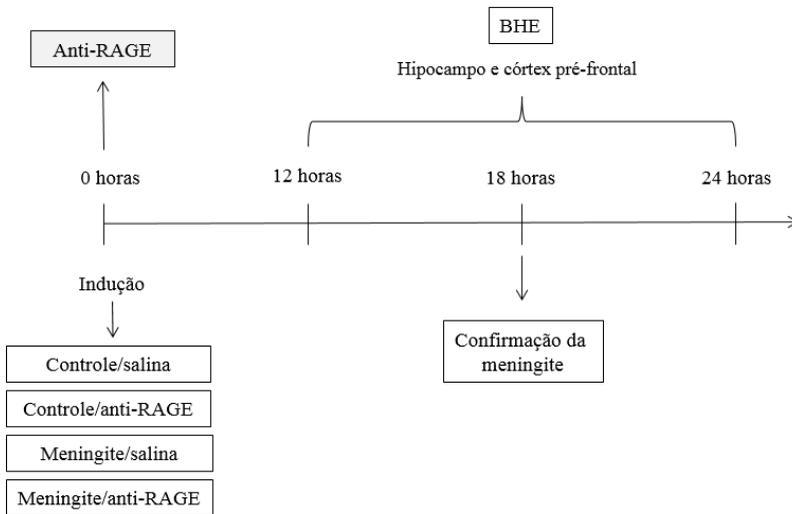


Figura 5: Esquema ilustrativo do protocolo experimental 2. Figura elaborada pelo autor, 2017.

Protocolo 3: para os testes comportamentais, os animais foram divididos em 3 grupos: controle/salina ($n = 10$), meningite/salina ($n = 10$) e meningite/anti-RAGE ($n = 10$) e dez dias após a indução os animais foram submetidos aos testes comportamentais de habituação ao campo aberto e reconhecimento de objetos novos ($n = 30$). Foram utilizados os mesmos animais para ambos testes comportamentais. Logo após, 6 animais de cada grupo foram decapitados e o cérebro removido e dissecado em hipocampo e córtex pré-frontal para as análises dos níveis de β -amiloide, RAGE, HMGB1 por Western blotting ($n = 18$).

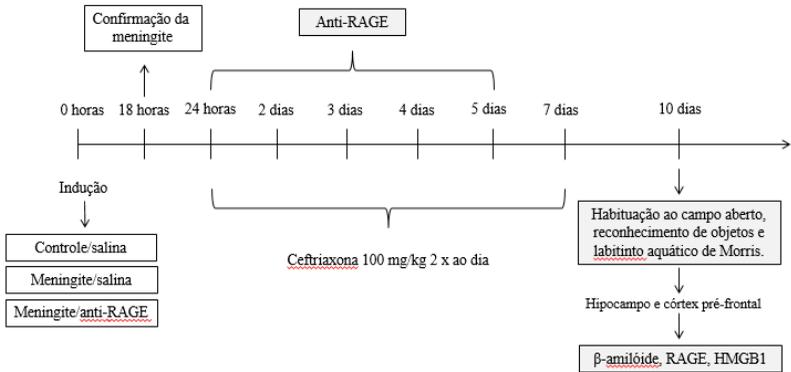


Figura 6: Esquema ilustrativo do protocolo experimental 3. Figura elaborada pelo autor, 2017.

3.7 TRATAMENTO

Os animais receberam 1,5 mg/Kg de N-benzil-4-cloro-N-ciclohexilbenzamida (FPS-ZM1) (Calbiochem®, Ucrânia) (Anti-RAGE) dissolvidos em 1% de DMSO 1% e solução salina ou salina estéril por via intraperitoneal. Para avaliação de citocinas e BHE os animais receberam anti-RAGE ou salina estéril, conforme grupo experimental, uma dose única intraperitoneal imediatamente após a indução.

Para os testes comportamentais, os animais receberam anti-RAGE ou salina estéril, conforme grupo experimental, uma dose por dia durante 5 dias, iniciando em 18 horas após a indução.

3.8 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF-A, IL-1B E IL-6

As estruturas foram homogeneizadas em solução de extração (100 mg de tecido por 1 mL) contendo: 0,4 mol/L de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de BSA, 0,1 mmol/L de fluoreto de fenil metil sulfonil, 0,1 mmol/L de cloreto de benzetônio, 10 mmol/L de EDTA e 20 de KI a aprotinina, utilizando Ultra-Turrax (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). O homogenato de cérebro foi centrifugado a 3000 x g durante 10 min a 4 °C, e os sobrenadantes serão recolhidos e armazenados a -20 °C. A concentração de citocinas e quimiocina foi determinada utilizando a metodologia de enzima e um ensaio de ELISA. Os sobrenadantes do tecido cerebral foram dosados em uma configuração de ELISA utilizando anticorpos comercialmente disponíveis, de acordo com os

procedimentos fornecidos pelo fabricante (R & D Systems, Minneapolis, MN).

3.9 INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA POR AZUL DE EVANS

Para analisar a integridade da BHE foi quantificado o extravasamento do corante azul de Evans para dentro de estruturas cerebrais (Smith e Hall, 1996) após 12, 18 e 24 horas da indução da meningite bacteriana. Uma hora e meia antes de serem eutanasiado, os animais foram devidamente anestesiados, e então administrado 1 mL de azul de Evans (1% dissolvido em solução salina 0,9%) por via intravenosa através da veia femoral (Kawai et al., 2001). É feita a sutura no local de acesso a veia femoral e os animais são devolvidos as suas respectivas caixas. Em seguida, sob nova anestesia, o tórax foi aberto e o cérebro perfundido com 200 mL de solução salina 0,9% através do ventrículo esquerdo na pressão de 100 mmHg até que o fluido de perfusão incolor foi obtido a partir do átrio direito aberto (Figura 6). Em seguida os animais foram mortos por decapitação, sendo as estruturas, hipocampo e córtex, retiradas e armazenadas a -80 °C para o posterior teste bioquímico.

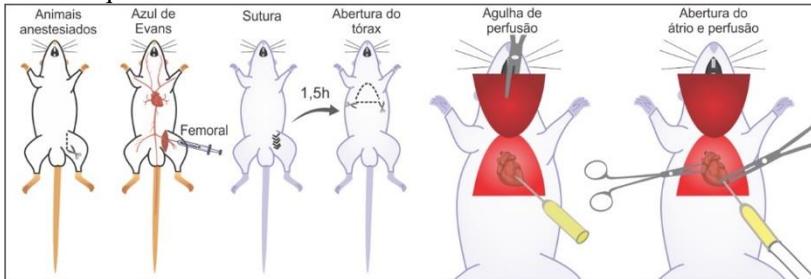


Figura 7: Ilustração do procedimento de perfusão. Figura elaborada pelo autor, 2017.

Para avaliação da BHE, as amostras foram pesadas e colocadas em 50% de solução tricloroacética. Após homogeneização e centrifugação, o corante extraído foi diluído com etanol (1:3) e determinada a sua fluorescência (excitação em 620 nm e emissão a 680 nm) com um espectrofotômetro de espectrofluorímetro (Hitachi 650-40, Tóquio, Japão). Os cálculos foram baseados no padrão externo (62,5-500 ng/mL) no mesmo solvente. O teor de azul de Evans no tecido foi

quantificado a partir de uma linha padrão linear derivada de quantidades conhecidas do corante e expressa por grama de tecido.

3.10 ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING

Para executar as o Western blotting, as amostras foram primeiro homogeneizadas em tampão Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% (p/v) de SDS, 10% (v/v) de glicerol). As concentrações de proteínas foram analisadas pelo método de Lowry (1951), e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína, foi utilizado 30 µg para a eletroforese em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando gel 10-15% (Leal et al., 2002). As proteínas separadas foram, em seguida, transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando tampão contendo Tris 20 mmol/L, glicina 150 mmol/L, metanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v) (pH 8,2) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. A carga de proteína e a eficiência da transferência foram verificadas com coloração Ponceau S. Após os sítios de proteínas inespecíficos foram bloqueados por uma hora de incubação com solução bloqueadora (5% albumina em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20). Posteriormente, as membranas foram incubadas durante a noite a 4 °C com o anticorpo para β-amiloide, RAGE e HMGB1. Após a incubação, o anticorpo primário foi removido e as membranas foram lavadas quatro vezes durante 15 min. Após a lavagem, os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição 1:2500) foram aplicados à membrana e uma incubação por 2 h à temperatura ambiente foi realizada e as membranas foram lavadas novamente. As bandas imunorreativas foram detectadas através de fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS - Bio-Rad) utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Carr and Scott, 1992). A quantificação das bandas foi avaliada utilizando-se o Software Image Lab (Bio-Rad). Seguidamente, a membrana foi submetida ao processo de ‘stripping’ e incubada com um anticorpo contra GAPDH na presença de 5% de leite. Após a lavagem, os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição 1:10000) foram aplicados à membrana e uma incubação por 1 hora à temperatura ambiente foi realizada e as membranas lavadas novamente. Finalmente, as bandas imunorreativas foram detectadas através de fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS-Bio-Rad) utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Carr and Scott, 1992). A densitometria das bandas foi avaliada utilizando-se o Software Image Lab (Bio-Rad). SeeBlue® Plus2 Prestained Standard (Invitrogen)

foi utilizado como um marcador de peso molecular para certificar-se de que as faixas corretas foram analisadas para MMP-2 e MMP-9.

3.11 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais de habituação ao campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris foram realizados 10 dias após a indução da meningite pneumocócica.

3.11.1 Habituação ao campo aberto

Utilizamos o teste de habituação ao campo aberto para avaliar a capacidade locomotora e exploratória dos animais. Ao ser colocado em um novo ambiente, é natural para ele uma atividade exploratória, se equilibrando nas patas traseiras (rearing), bem como a atividade locomotora do animal (crossing). Foi realizado em um campo aberto de 40 por 60 cm rodeado por paredes de 50 cm de altura sendo 3 paredes de madeira e uma na frente de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 retângulos iguais por linhas pretas.

Na sessão de treino os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante traseiro esquerdo, e deixados a explorar o campo por 5 min e em seguida, os animais foram levados de volta para suas respectivas gaiolas. No dia seguinte, 24h após a sessão treino, os animais foram novamente submetidos ao aparato para ser realizado a sessão de teste.

Os cruzamentos das linhas pretas (crossing) e levantamentos (rearing) (Figura 8) realizados em ambas as sessões foram contados. A diminuição do número de cruzamentos e levantamentos entre as duas sessões foi tomado como uma medida da retenção de habituação (Roesler et al., 2003).

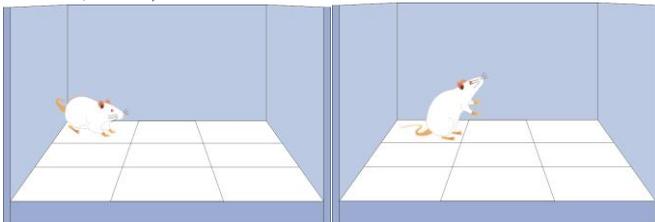


Figura 8: Teste de habituação ao campo aberto. Figura elaborada pelo autor, 2017.

3.11.2 Memória de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos novos foi usado para avaliar a capacidade de memorizar e reconhecer os objetos novos e os já conhecidos, avaliando a memória de curta e de longa duração. O aparato tem as mesmas medidas do teste de Habituação ao Campo Aberto. No primeiro dia foi realizado a sessão treino, onde o animal é colocado cuidadosamente no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, no qual explorará o ambiente por 5 minutos. O primeiro dia serve como habituação do animal.

No segundo dia o animal foi recolocado no aparato, no qual tem dois objetos iguais (forma, tamanho e cor), objeto A e objeto B. Foi contado o tempo que o animal explorou cada objeto (A e B)(De Lima et al., 2005).

No terceiro dia (24 horas após) avaliou-se a memória de longa duração onde foi feito o mesmo procedimento trocando o objeto B por um diferente, um objeto C, novamente é contado o tempo de exploração de cada objeto.

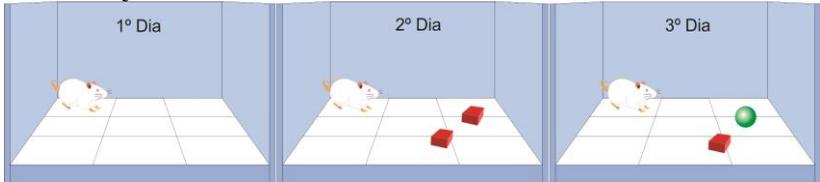


Figura 9: Teste de reconhecimento de objetos novos. Figura elaborada pelo autor, 2017.

3.11.3 Labirinto aquático de Morris

Para testar a aprendizagem e a memória espacial de longo prazo além de ser um teste que reduz a interferência de odor nas trilhas feitas pelos ratos. Este teste vem sendo descrito como importante em roedores que avaliam neurodegeneração, comumente usados na doença de Alzheimer. O labirinto aquático de Morris é um tanque circular (150 cm) com paredes de 50 centímetros de altura com 30 cm de profundidade de água a temperatura de 22 ± 1 °C. Durante todos os procedimentos o animal a ser testado não pode ver quem está o testando. Uma plataforma (transparente: 10 cm x 10 cm) foi colocada no centro de um quadrante do labirinto. Um sinal de contraste foi colocado na plataforma. No primeiro dia usamos uma plataforma visível, acima do nível da água. Os ratos foram retirados de suas gaiolas e cuidadosamente colocados na água de frente para a borda da piscina. Se o rato encontra a plataforma antes dos 60 segundos ele era deixado lá durante 5 segundos.

Se ele não a encontrava era colocado na plataforma pelo experimentador e deixado lá durante 20 segundos. Foram repetidos esse procedimento 3 vezes, com intervalos de um minuto, sempre colocando o rato em um quadrante diferente. Após isso eles retornavam a suas gaiolas. Para os dias 2, 3 e 4 a plataforma foi submersa em um centímetro abaixo do nível da água e o sinal de contraste retirado e o mesmo procedimento realizado. O parâmetro medido foi o tempo necessário para alcançar a plataforma. No último dia, a plataforma foi removida e foi analisado o tempo gasto pelo rato no quadrante em que ela estava. Durante os testes, o comportamento dos animais foi rastreado e analisado com um sistema assistido por computador vídeo tracking.

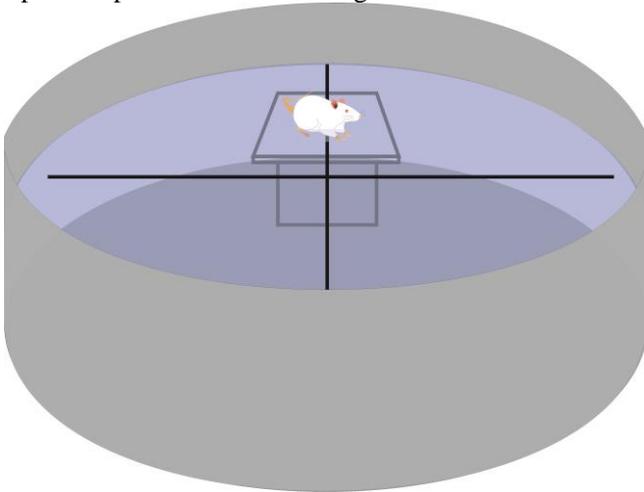


Figura 10: Labirinto aquático de Morris. Figura elaborada pelo autor, 2017.

3.12 DESCARTE DAS COBAIAS

Após os experimentos, todos os animais foram devidamente eutanasiados com uso de guilhotina, sob estrita obediência às Diretrizes para a Prática de Eutanásia (CONCEA, 2013). O descarte foi feito por acondicionamento em saco branco leitoso, identificados como “lixo infectante” e levados para um freezer de resíduos localizado no biotério da UNESC para a conservação até o momento de coleta por uma empresa terceirizada, que fez o tratamento e disposição final, conforme RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e para homogeneidade usando o teste de Levene. Os dados que foram normais e homogeneidade de variância confirmada, foram submetidos a testes paramétricos; já os dados que não cumpriram estas condições, foram utilizados os testes não-paramétricos.

Para as análises de citocinas, os dados foram apresentados como média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Newman keuls. Para as análises BHE os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Tukey.

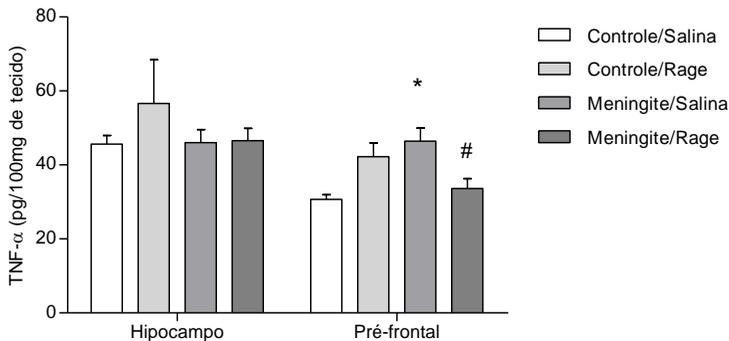
Dados da tarefa de habituação ao campo aberto foram relatados como média \pm EPM, e a comparações dentre os grupos foram feitas utilizando-se teste t de Student pareado. Dados do reconhecimento de objetos foram realizados pelo teste U-Mann-Whitney. As comparações dentro dos grupos foram realizadas pelo teste de Wilcoxon.

Em todas as comparações, $p < 0,05$ foi considerado significativamente estatístico. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistical Package for the Social Science (SPSS) versão 20.0.

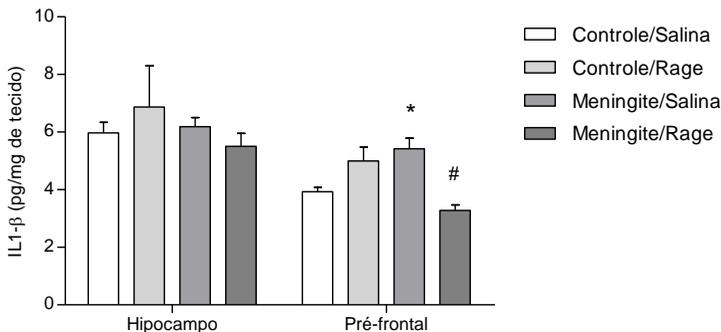
4 RESULTADOS

Na figura 10 demonstra-se os níveis de TNF α , IL-1 β e IL-6 no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 24 horas após a indução à meningite pneumocócica e tratados ou não com anti-RAGE. No córtex pré-frontal, os níveis de TNF- α (10A, $p = 0,0168$), IL-1 β (10B, $p = 0,0243$) e IL-6 (10C, $p = 0,0103$) aumentaram nos animais do grupo meningite/salina quando comparados ao grupo controle/salina. Entretanto os animais que receberam a administração de anti-RAGE apresentaram uma diminuição dos níveis TNF- α ($p = 0,0341$), IL-1 β ($p = 0,009$) e IL-6 ($p = 0,0252$) quando comparados ao grupo meningite/salina. No hipocampo, não houve alterações significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

A



B



C

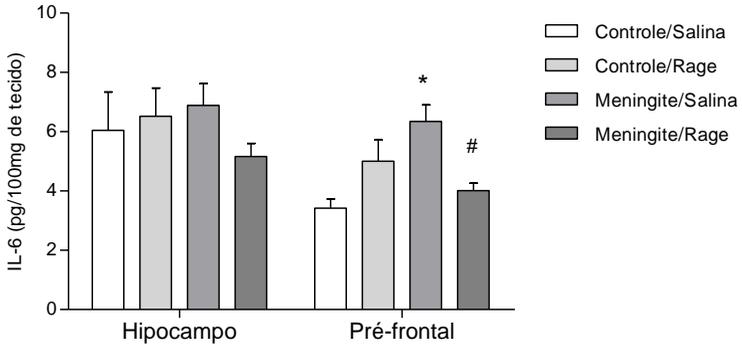
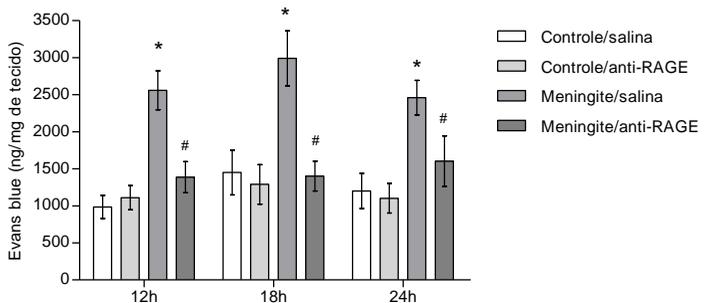


Figura 11: Avaliação dos níveis de TNF α (em A), IL-1 β (em B) e IL-6 (em C) no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica tratados ou não com anti-RAGE. Os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Newman keuls. Fonte: do autor.

A integridade da BHE foi avaliada no hipocampo e córtex cerebral através do extravasamento do corante azul de Evans em 12, 18 e 24 horas após a indução da meningite pneumocócica, demonstrado na figura 11. Em ambas estruturas, hipocampo (A) e córtex cerebral (B), houve quebra da BHE nos grupos meningite/salina em todos os tempos avaliados ($p < 0,05$). Já nos animais que receberam anti-RAGE houve prevenção da disfunção da BHE quando comparados ao grupo meningite/salina ($p < 0,05$).

A



B

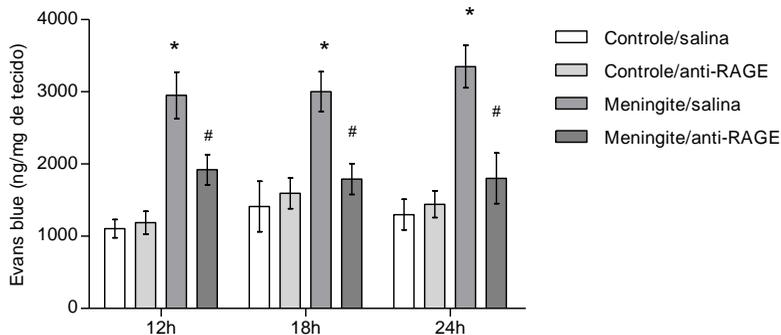


Figura 12: Integridade da BHE em animais submetidos à meningite por *S. pneumoniae* e tratados ou não com anti-RAGE. Os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Tukey. Os símbolos * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo controle/salina; # $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/salina. Fonte: do autor.

A figura 12 ilustra a tarefa de habituação ao campo aberto e a influência do uso de anti-RAGE na memória de habituação 10 dias após a indução da meningite pneumocócica. Não houve diferenças no número de cruzamentos (crossing) e levantamentos (rearing) e levantamentos entre os grupos na sessão treino, demonstrando não haver diferença na atividade motora e exploratória entre os grupos. O grupo meningite/salina não apresentou diferença na atividade motora e exploratória entre as sessões treino e teste, demonstrando comprometimento da memória de habituação nesse grupo. Entretanto, na sessão teste, houve redução significativa nos cruzamentos e levantamentos no grupo controle e meningite/anti-RAGE quando comparado com a sessão treino, demonstrando memória de habituação nesses grupos ($p < 0,05$).

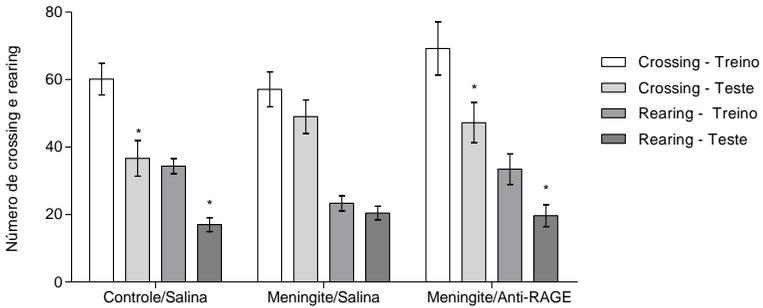


Figura 13: Teste de habituação ao campo aberto 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 10 animais por grupo e as comparações dentro dos grupos foram feitas utilizando teste t de Student pareado. * $p < 0.05$ indicam significância estatística entre as sessões treino e teste. Fonte: do autor.

A figura 13 apresenta o resultado do teste comportamental de reconhecimento de objetos novos. O grupo meningite/salina não apresentou um tempo significativamente maior na exploração do objeto novo, representando um prejuízo de memória de longo prazo. Os animais do grupo controle/salina e meningite tratado com anti-RAGE apresentaram memória de longo prazo entre as sessões teste em comparação com a sessão treino ($p < 0,05$).

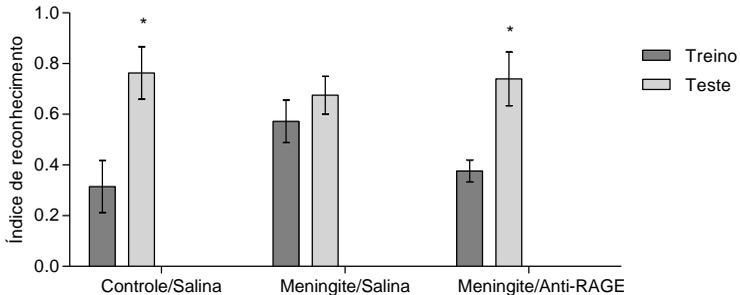
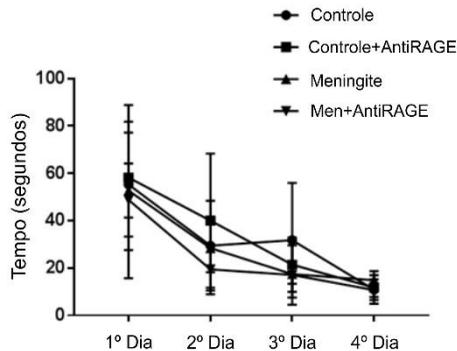


Figura 14: Teste de reconhecimento de objetos 10 dias após a indução da meningite pneumocócica. Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil, de 10 animais por grupo e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. As comparações dentro de cada grupo foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. * $p < 0.05$ indicam significância estatística entre as sessões treino e teste. Fonte: o autor.

Na figura 15, avaliamos o déficit de memória espacial através do teste comportamental labirinto aquático de Morris. A latência de escape diminuiu ao longo do período de treinamento de 4 dias (15A). Os animais do grupo meningite tiveram uma redução do tempo gasto no quadrante alvo quando comparado ao grupo controle, demonstrando prejuízo de memória espacial. Entretanto, os animais que receberam administração de anti-RAGE mostraram um aumento de tempo gasto no quadrante, sugerindo retenção de memória espacial (15B).

A



B

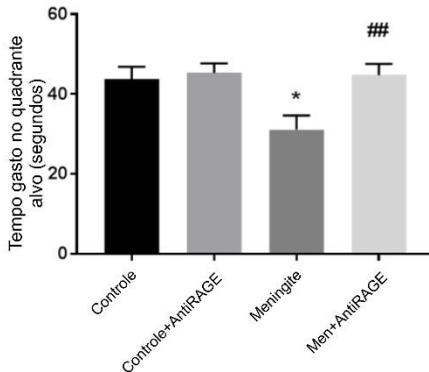
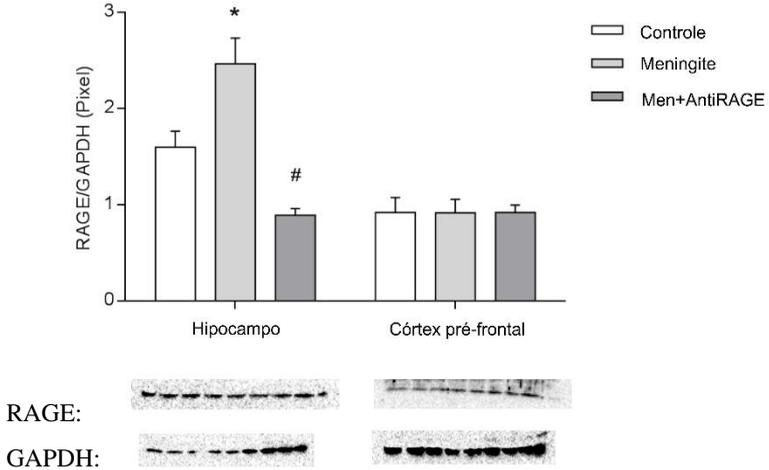


Figura 15: Teste labirinto aquático de Morris 10 dias após a indução a meningite pneumocócica. * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo controle/salina; ## $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/salina. Fonte: do autor

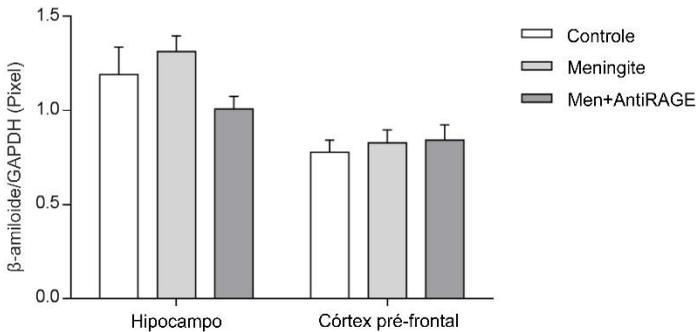
Na figura 16, avaliamos a expressão de RAGE, β -amiloide e HMGB1 no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 10

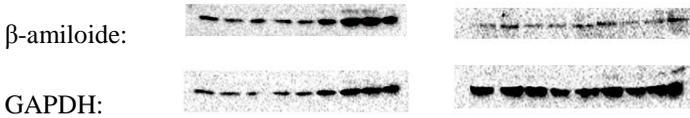
dias após a indução de meningite pneumocócica. A expressão de RAGE foi aumentada no hipocampo dos animais do grupo meningite/salina quando comparado ao grupo controle/salina (11A, $p < 0,05$). Entretanto, os animais que receberam administração de anti-RAGE mostraram uma diminuição de RAGE ($p < 0,05$). A expressão de β -amiloide e HMGB1 não foi alterada e, nenhuma estrutura avaliada ($p > 0,05$).

A



B





C

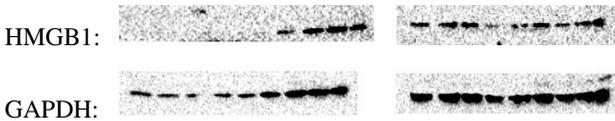
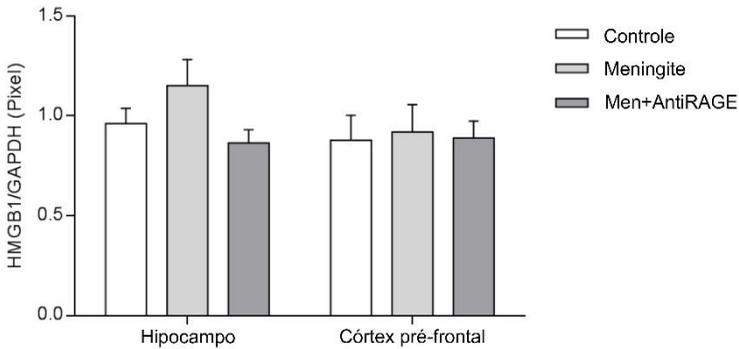


Figura 16: Avaliação da expressão de RAGE (A), β -amilóide (B) e HMGB1 (C) no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar submetidos à meningite por *S. pneumoniae* e tratados ou não com anti-RAGE. Os dados foram expressos como média \pm EPM e os grupos foram comparados utilizando teste *t* Student pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/salina. Ordem das bandas: controle, controle, controle, meningite, meningite, meningite, RAGE, RAGE, RAGE. Fonte: do autor.

5 DISCUSSÃO

Os mecanismos fisiopatológicos da meningite bacteriana são complexos. Entender como funcionam é essencial para obter avanços na prevenção e tratamento desta patologia que continua a ser uma das mais disseminadas e letais doenças infecciosas em todo o mundo (Costerus et al., 2017). O presente estudo demonstrou que a inibição do RAGE atenuou algumas alterações fisiológicas e comportamentais comumente observadas na meningite bacteriana. Alterações que também estão associadas ao início de processos neurodegenerativos.

O RAGE é uma molécula de sinalização central do sistema imune inato. Este receptor está envolvido na resposta inflamatória do hospedeiro e é capaz de reconhecer uma variedade de ligantes com diferentes propriedades e origem (Fritz, 2011). O RAGE é um receptor importante que reconhece AGEs, membros da família de proteínas S100, fibrilas amiloides e β -amiloide, HMGB-1 e antígeno de macrófagos β -integrina 1 (Mac1) (Fritz, 2011; Harris et al., 2012). A inflamação sistêmica e a neuroinflamação aparentemente, se apresentam como fatores importantes ao declínio cognitivo do cérebro envelhecido (Cunningham e Hennessy, 2015). Na sepse por exemplo, a resposta endógena de proteção pode ser desencadeada pela ativação da via β -amiloide, HMGB-1 e RAGE/NF- κ B. Essas potenciais vias de resposta pró-neurogênicas também contribuem para a produção de mediadores inflamatórios e compostos neurotóxicos no cérebro (Meneghini et al., 2013). Um estudo anterior com modelo experimental de sepse, foram encontrados níveis elevados de HMGB-1, IL-1 β e NADPH oxidase, que são marcadores associados ao comprometimento cognitivo de longo prazo (Comim et al., 2009). Esses achados na literatura são importantes, pois esses mediadores pró-inflamatórios estão associados ao RAGE e sua inibição se torna um alvo terapêutico relevante.

As citocinas podem ativar membros das cinases da família Src (SFKs) que participam da regulação da disfunção da barreira endotelial associada à inflamação (Nwariaku et al., 2002). A ruptura da BHE induzida por citocinas foi acompanhada de fosfotirosina elevada nos vasos sanguíneos in vivo (Bolton et al., 1998). Em estudo anterior com ratos jovens, a BHE foi danificada às 12 e 24 horas após a indução de meningite por *S. pneumoniae*. O ponto de tempo em que houve a quebra da BHE foi associado aos níveis mais altos de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias durante a meningite (Barichello et al., 2011). Em um outro estudo in vitro, as citocinas induziram uma ruptura da BHE, indicando que as citocinas ativam as células endoteliais cerebrais para

produzir eicosanóides, que posteriormente induziram a abertura da BHE (De Vries et al., 1996).

A inflamação cerebral causada pelo *S. pneumoniae* está associada a uma resposta imune intensa, no entanto, essa resposta pode ser mais prejudicial ao paciente do que o próprio patógeno. Os efeitos pró-inflamatórios de *S. pneumoniae* incluem a exotoxina, a pneumolisina, que induz a ativação do complemento, a ativação aprimorada de neutrófilos, o aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α , IL-1 β e IL6, produção de óxido nítrico e aumento de metaloproteinases de matrix, que são marcadores importantes na virulência do pneumococo (Leib et al., 2000; Cockeran et al., 2001), que contribuem para o desenvolvimento de lesão cerebral na meningite bacteriana (Waage et al., 1989; Leib et al., 2000).

O TNF- α é uma das principais citocinas pró-inflamatórias liberadas de vários tipos celulares e pode ser sintetizada no SNC por microglia, astrócitos e algumas populações de neurônios após lesão cerebral (Lieberman et al., 1989). O TNF- α está associado a ativação do NF- κ B, apoptose e necrose celular (Harashima et al., 2001). A deficiência de TNF- α não pôde inibir o recrutamento de leucócitos e diminuir a bacteremia no espaço subaracnóideo, no entanto, os ratos que não possuem ambos os receptores de TNF, p55 e p75, apresentaram diminuição da inflamação (Wellmer et al., 2001). Níveis elevados de TNF- α têm sido associados aos efeitos patológicos de uma variedade de doenças infecciosas, neurológicas, neurodegenerativas e neurotóxicas (Sriram e O'callaghan, 2007). No presente estudo os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL6 estiveram aumentados no córtex pré-frontal 24 horas após os ratos serem induzidos a meningite, quando comparados ao grupo controle. Sendo que a administração do inibidor de RAGE FPS-ZM1 levou a uma redução significativa.

Dados semelhantes foram encontrados em um estudo anterior em que IL-1 β e IL-6, tiveram aumento de seus níveis no córtex pré-frontal 24 horas após a indução, mas no hipocampo não houve alteração (Barichello, Dos Santos, et al., 2010). Uma possível explicação é que diferentes regiões cerebrais podem ser mais sensíveis ao agente. De acordo com a região e a função da célula, pode haver uma expressão maior de um fator de transcrição específico (Gerlofs-Nijland et al., 2010). A atividade do NF- κ B tem sido associada à neurogênese e à sobrevivência neuronal através da expressão de genes anti-apoptóticos, embora esse fator de transcrição também tenha sido implicado na neurodegeneração por causa de suas características pró-inflamatórias. Aparentemente, dependendo da região e da intensidade em que é

expresso o NF- κ B, ou até mesmo do tipo de célula é que vai determinar sua atividade de neuroproteção ou neurotoxicidade (Sarnico et al., 2009). As citocinas TNF- α e IL-1 β têm várias funções fisiológicas na resposta neuroinflamatória (Waage et al., 1989). Em particular, a IL-1 β é conhecida por induzir a produção de outras citocinas e fatores de crescimento (Benveniste, 1992). O TNF- α e IL-1 β aumentaram a expressão de p75 em cultura de neurônios e astrócitos de hipocampus, e este receptor de neurotrofina é re-expresso em várias condições patológicas, como lesão cerebral traumática, convulsão, isquemia, estresse oxidativo e lesão axonal (Choi, 2001).

Um estudo anterior demonstrou, que a atividade da creatina cinase diminuiu em 24 horas após a indução da meningite por *S. pneumoniae* (Barichello et al., 2009) e Grandgirard et al. (2007) mostrou que a apoptose no giro dentado de camundongos infectados com *S. pneumoniae* apresentou um pico de 30 horas após a infecção, seguido de uma diminuição da apoptose, voltando aos níveis normais em 40 horas (Grandgirard, et al., 2007). Este estudo, demonstrou um aumento na atividade dos níveis de citocinas 24 horas após a indução de meningite, próximo ao pico máximo de apoptose. Esses dados também são encontrados em outras doenças neurodegenerativas, como a esclerose múltipla e a doença de Parkinson. Os níveis de TNF- α também estão elevados no LCR e nos tecidos dos pacientes com doença de Alzheimer, bem como nos cérebros post-mortem (Hofman et al., 1989).

Em 12, 18 e 24 horas após a indução do modelo experimental de meningite observou-se um aumento de permeabilidade da BHE em ambas as estruturas, hipocampo e córtex cerebral, que foi revertido com a inibição do RAGE. Níveis elevados e prolongados de bacteremia favorecem a penetração do *S. pneumoniae* no espaço subaracnóideo (Costerus et al., 2017) que após ultrapassar a BHE multiplica-se no LCR facilmente, podendo atingir até 109 UFCol/mL colonizando toda a superfície do cérebro (Zwijnenburg et al., 2006). Com o crescimento bacteriano no espaço subaracnóideo, o *S. pneumoniae* desencadeia uma resposta imune exacerbada devido a liberação de componentes bacterianos (Coimbra et al., 2006). A degradação aguda da BHE, a produção de citocinas e o acúmulo de leucócitos derivados do sangue no LCR são eventos importantes no desenvolvimento da doença que levam a edema cerebral e lesão neuronal em meningite bacteriana (Leib e Tauber, 1999). Em um experimento anterior, onde a integridade da BHE foi danificada pela administração do anestésico volátil isoflurano, o tratamento com anticorpo anti-RAGE mostrou que o RAGE

desempenha um papel importante na manutenção da integridade da BHE (Shi et al., 2017).

As intervenções farmacológicas direcionadas usando inibidores de AGE, anticorpos anti-RAGE ou antagonistas de RAGE podem ser estratégias terapêuticas promissoras para retardar a progressão do declínio cognitivo na neurodegeneração (Shen et al., 2017). Enquanto a maioria das estratégias atuais para o tratamento da meningite pneumocócica é dada pela eliminação da bactéria, estratégias que minimizam a resposta imune exacerbada são importantes.

No presente estudo os animais submetidos à meningite pneumocócica apresentaram prejuízo de memória de habituação e reconhecimento de objetos novos 10 dias após a indução. Este modelo experimental de neuroinflamação por meningite apresenta dados semelhantes ao modelo de inflamação por sepse, em que animais sobreviventes apresentaram o aumento de β -amiloide e comprometimento cognitivo (Schwalm et al., 2014). As interações AGEs-RAGE induzem estresse oxidativo intracelular, levando ao dano das células nervosas (Deane et al., 2009). O estresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento da doença de Alzheimer, promovendo a deposição de β -amiloide, hiperfosforilação de tau e perda de neurônios e sinapses (Smith et al., 2000). Em um estudo anterior mostrou que os AGEs melhoram a expressão da proteína precursora amiloide induzindo a produção de ERO sendo que os efeitos dos AGEs são bloqueados quando as células são pré-tratadas com um inibidor de ERO (Ko et al., 2010). Outro estudo demonstrou que a interação de AGEs com RAGE induz a produção de ERO através de NADPH oxidase, resultando em estresse oxidativo (Gu et al., 2014). O estresse oxidativo contribui para a degeneração neuronal e pode estar associado a comprometimento cognitivo no processo de envelhecimento e em doenças neurodegenerativas como a esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e depressão (Lindqvist et al., 2017).

Na sepse, o estresse oxidativo está diretamente correlacionado com o comprometimento cognitivo em um modelo animal (Barichello et al., 2009). As ERO podem causar danos aos lipídios, proteínas, carboidratos ou ácidos nucleicos, aumentando o risco de sequelas particularmente no hipocampo (Hoogman et al., 2007). Sendo que neste estudo a inibição do RAGE com o FPS-ZM1 nos animais submetidos a meningite pneumocócica mostrou uma melhor retenção de memórias de longo prazo no teste de reconhecimento de objetos novos e na memória de habituação. Dados sugerem que a inflamação sistêmica induz alterações de longo prazo no hipocampo e córtex pré-frontal que são de

alguma forma semelhantes a um processo neurodegenerativo. Essas alterações moleculares e estruturais estão ligadas a um fenótipo de disfunção cognitiva que depende do hipocampo e das conexões pré-frontais (Gasparotto et al., 2017).

No presente estudo, observou-se que o RAGE foi aumentado no hipocampo dos animais do grupo meningite. Acredita-se que este aumento possa estar relacionado com os prejuízos de aprendizagem, memória, aumento de citocinas e disfunção da integridade da BHE após a indução da meningite pneumocócica em modelo experimental. Um estudo com cultura de células primárias de microglia, mostra que o aumento da expressão de RAGE aumentou parâmetros de estresse oxidativo e inflamação, mas o tratamento com inibidor de RAGE, FPS-ZM1, protegeu a microglia primária do estresse oxidativo contribuindo para uma melhora no dano neurológico. Neste mesmo estudo o FPS-ZM1 suprimiu significativamente o aumento da expressão do RAGE induzida por AGEs, a ativação microglial dependente de RAGE, a translocação nuclear do NF- κ B e a expressão de mediadores inflamatórios a jusante, como o TNF- α , IL-1 β , COX-2, prostaglandina, iNOS e NO. Além disso, FPS-ZM1 atenuou a expressão de NADPH oxidase (NOX) estimulada por AGEs e a expressão de ERO (Shen et al., 2017). Logo, a inibição do RAGE com um inibidor específico, o FPS-ZM1 também se torna uma terapia adjuvante no tratamento de doenças pneumocócicas. O FPS-ZM1 é um inibidor específico de RAGE de alta afinidade que bloqueia a ligação de β -amiloide ao domínio V de RAGE e inibe o estresse celular induzido por β -amiloide40 e β -amiloide42. A identificação deste inibidor foi feita em células que expressam RAGE in vitro e no cérebro de camundongos in vivo. O FPS-ZM1 não é tóxico para ratos e atravessava facilmente a BHE (Deane et al., 2012).

A ativação de RAGE desencadeia diferentes cascatas de sinalização da resposta imune, incluindo a ERK 1/2 que ativa NF- κ B e conseqüentemente transcrição de genes pró-inflamatórios. Após a ativação do RAGE o estresse oxidativo aumenta o que aumenta a expressão de RAGE, tornando um ciclo vicioso que contribui para a neuroinflamação (Tobon-Velasco et al., 2014). Em uma revisão a expressão de RAGE no SNC, foi associada a neuroinflamação, quebra da BHE e neurodegeneração (Srikanth et al., 2011; Li et al., 2012). Um estudo prévio mostrou que FPS-ZM1 suprime substancialmente a ativação microglial e a expressão relacionada a NF- κ B de citocinas pró-inflamatórias induzidas por microglia, incluindo TNF- α e IL-1 β , no hipocampo e no córtex de camundongos transgênicos (Deane et al., 2012). Um outro estudo que comparou as proteínas extraídas do núcleo

em relação ao citoplasma, demonstra que a ativação do RAGE aumentou a translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo. No entanto este efeito foi diminuído nas culturas de células tratadas com FPS-ZM1 (Shen et al., 2017). E modelo animal com administração de AGEs diretamente no hipocampo mostrou níveis aumentados de NF- κ B, TNF- α e IL-1 β no hipocampo dos ratos sendo que o tratamento com FPS-ZM1 reverteu esses efeitos (Hong et al., 2016).

O labirinto aquático de Morris tem sido amplamente utilizado para avaliar aprendizado e memória espacial em modelo animal para dano cognitivo, como a doença de Alzheimer (Sun et al., 2006; Qing et al., 2008; Mann et al., 2017; Wang et al., 2017). Neste estudo, observou-se que a inibição do RAGE com o uso do FPS-ZM1 atenuou déficit de memória espacial 10 dias após a indução da meningite pneumocócica. No processo inflamatório ocasionado pela meningite bacteriana é observado um aumento de TNF- α corroborando com um outro estudo que utilizou inibidores de TNF- α e observaram redução na inflamação e uma possível prevenção da memória cognitiva também presente na doença de Alzheimer testada através do labirinto aquático de Morris (Shamim e Laskowski, 2017). Assim como outro estudo que usou hipericina e reduziu significativamente a expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS e produção de NO na microglia induzida por oligômero de β amiloide42. Também tiveram os parâmetros de memória e aprendizagem testados no labirinto aquático concluindo que a droga é um candidato ao tratamento da doença de Alzheimer (Zhang et al., 2016).

Níveis elevados de AGEs são encontrados em cérebros de pacientes com Alzheimer e a interação com seu receptor apresenta um papel importante nesta doença. O FPS-ZM1 bloqueia a ligação de β -amiloide ao RAGE diminuindo dano neurológico e inflamação em modelo de rato transgênico (Deane et al., 2012). Em um modelo animal com ratos que receberam injeção intra-hipocampal de AGEs com administração intraperitoneal de FPS-ZM-1 tiveram um possível efeito neuroprotetor. Foi descoberto que a administração de AGEs induz a produção de β -amiloide, aumenta a inflamação, estresse oxidativo e a latência de escape no teste de labirinto aquático de Morris. Tendo todos esses efeitos amenizados com o tratamento com FPS-ZM1, sugerindo um potencial agente terapêutico para tratar pacientes com Alzheimer (Hong et al., 2016).

Um aumento progressivo na produção de β -amiloide é observado nos animais induzidos a meningite pneumocócica, e a inibição do RAGE foi capaz de inibir esses efeitos 10 dias após a indução sugerindo

uma ligação entre o RAGE e a β -amiloide. Observações anteriores mostraram que a inibição de RAGE impediu a produção de β -amiloide, inflamação, estresse oxidativo e déficits cognitivos em um modelo animal de doença de Alzheimer e em ratos que receberam AGE intra-hipocampo (Deane et al., 2012).

Um importante DAMP liberado no processo inflamatório causado pela meningite bacteriana é o HMGB-1, encontrada no LCR de pacientes com meningite bacteriana (Tang et al., 2008). Os receptores TLR2, TLR4 e RAGE, são responsáveis por reconhecer essa proteína (Meneghini et al., 2013). A importância do HMGB-1 no processo inflamatório da meningite pneumocócica foi demonstrada pela administração adjuvante de um anticorpo para esta proteína em modelo animal de meningite, cujo resultado foi a diminuição da mortalidade dos camundongos afetados pela doença (Masouris et al., 2017). Em um outro estudo, mostrou uma liberação de grande quantidade de HMGB-1 no LCR de adultos com meningite pneumocócica, sendo que sua concentração esteve mais elevada em 45 horas do que 24 horas após a infecção. Quando esses animais foram tratados com um antagonista do HMGB-1 tiveram a inflamação resolvida de maneira mais rápida (Hohne et al., 2013). Entretanto, neste estudo, não houve alteração na expressão de HMGB-1 no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos com meningite pneumocócica.

O desenvolvimento de danos neuronais causados pela meningite pneumocócica está associado a intensa resposta imune, sugerindo que as ERO estão, direta ou indiretamente, envolvidas nesse processo (Barichello, et al., 2010c). Já foi demonstrado em estudos anteriores que a BHE foi quebrada em 12 horas após a indução da meningite por *S. pneumoniae* em ratos adultos (Barichello et al., 2012) ainda que já apresentando a produção de citocinas (Barichello, et al., 2010b). A produção de citocinas e quimiocinas e moléculas de adesão celular induz citotoxicidade e apoptose em células endoteliais microvasculares, permitindo a translocação bacteriana através da BHE (Kim, 2003). As diferenças nos marcadores associados a inflamação podem demonstrar efeitos negativos as estruturas cerebrais. Já foi observado que a inflamação sistêmica induzida por LPS, em modelo animal, causa perda de neurônios tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal, com perda substancial de inervações colinérgicas, semelhante a um processo neurodegenerativo e diferentes tipos de déficits cognitivos foram observados neste modelo (Semmler et al., 2007).

A expressão de RAGE no SNC adulto, está frequentemente associada à microglia e aos astrócitos, embora também possa ser

induzida nos neurônios. O mecanismo de relação entre RAGE e fosforilação de tau no cérebro pode envolver a regulação ascendente de RAGE como consequência da ativação de microglia e astrócitos, liberação de mediadores pró-inflamatórios para o meio extracelular e consequente ativação de caminhos neurotóxicos nos neurônios que participam da fosforilação da tau (Zilka et al., 2012). No SNC, o RAGE é ativado e regulado por ligantes e citocinas produzidos externamente tendo seus efeitos intracelulares ocorrendo junto com sua ativação. Um dos efeitos é a fosforilação da AKT que está aumentada juntamente com os marcadores de RAGE, sendo componentes importantes em processos neurodegenerativos e inflamatórios (Dent, 2014). Em doenças neurodegenerativas, a ativação neuronal de ERK 1/2 geralmente está associada à GSK3- β que em cascata faz a regulação da fosforilação de tau, enquanto que na glia estas cinases estão associadas à inflamação (Kamat et al., 2014). Uma consequência da ligação RAGE é a ativação de NF- κ B através de ERK 1/2, que por sua vez ativa citocinas inflamatórias e a transcrição de RAGE. Alternativamente, a ativação de Akt está associada a respostas de sobrevivência, incluindo a inibição da ativação pró-inflamatória e a depuração autofágica de agregados proteicos (Heras-Sandoval et al., 2014).

Juntamente com as evidências encontradas na literatura, os dados encontrados neste estudo, sugerem que as citocinas podem ser um biomarcador para danos cerebrais nas primeiras horas da meningite pneumocócica. Esses marcadores também poderão ajudar em avanços na medicina a implementar um tratamento mais eficaz ou protetivo que amenizem os danos causado pela meningite pneumocócica. Em estudos anteriores, RAGE apresentou um papel importante no desenvolvimento de alterações bioquímicas e comportamentais em modelo de inflamação por sepse, comumente associadas ao início de processos neurodegenerativos, além de apresentar uma visão valiosa para a compreensão de fatores semelhantes que poderiam associar episódios de inflamação sistêmica aguda à ativação de sinalização neurodegenerativa associada no SNC (Gasparotto et al., 2017). Assim como pode-se observar no presente estudo, a influência do RAGE no decorrer do processo inflamatório ocasionado pela indução a meningite pneumocócica pode estar relacionada ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas tardias.

Um estudo no Japão sugeriu que polimorfismos no gene que codifica o RAGE pode estar envolvido numa suscetibilidade genética ao desenvolvimento da doença de Alzheimer (Takeshita et al., 2017). Em uma revisão recente, que analisou estudos clínicos que visam estabelecer

novas terapias de tratamento para a doença de Alzheimer, verificou-se que a maior parte dos estudos clínicos que visam amenizar os sintomas desta doença, estão trabalhando com um inibidor da enzima de clivagem de β -secreção (BACE) (verubecestat), três anticorpos monoclonais anti- β -amiloide (solanezumab, gantenerumab e aducanumab), um inibidor do RAGE (azeliragon) e a combinação de cromolênio de sódio e ibuprofeno (ALZT-OP1) (Panza et al., 2016). Demonstrando um papel importante da inibição do RAGE na progressão desta doença neurodegenerativa. Com o envelhecimento da população, esses tipos de doenças irão se tornar cada vez mais frequentes.

6 CONCLUSÃO

Muitos estudos ainda são necessários acerca de todas as vias e cascatas inflamatórias envolvidas na inflamação do SNC. O RAGE tem um papel importante na neuroinflamação ocasionada por meningite pneumocócica. Compreender mais detalhadamente este mecanismo se torna indispensável na busca de melhores formas para amenizar possíveis danos causados ao paciente.

O tratamento com um inibidor de RAGE se mostrou eficaz na neuroproteção pois diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias, reverteu o dano causado a BHE e atenuou o comprometimento da memória em modelo experimental de meningite pneumocócica.

REFERÊNCIAS

- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):13-25.
- Abraham AL, Focaccia R, Gattaz WF. Childhood meningitis increases the risk for adult schizophrenia. *World J Biol Psychiatry.* 2005;6 Suppl 244-8.
- Allison DJ, Ditor DS. The common inflammatory etiology of depression and cognitive impairment: a therapeutic target. *J Neuroinflammation.* 2014;11(151):014-0151.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2011;377(9770):1019-31.
- Banks WA. Blood-brain barrier as a regulatory interface. *Forum Nutr.* 2010;63102-10.
- Barichello T, Belarmino E, Jr., Comim CM, Cipriano AL, Generoso JS, Savi GD, Sertiz L, Kapczinski F, Quevedo J. Correlation between behavioral deficits and decreased brain-derived neurotrophic [correction of neurotrophic] factor in neonatal meningitis. *J Neuroimmunol.* 2010;223(1-2):73-6.
- Barichello T, Dos Santos I, Savi GD, Simoes LR, Silvestre T, Comim CM, Sachs D, Teixeira MM, Teixeira AL, Quevedo J. TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *J Neuroimmunol.* 2010;221(1-2):42-5.
- Barichello T, Generoso JS, Milioli G, Elias SG, Teixeira AL. Pathophysiology of bacterial infection of the central nervous system and its putative role in the pathogenesis of behavioral changes. *Rev Bras Psiquiatr.* 2013;35(1):81-7.
- Barichello T, Generoso JS, Silvestre C, Costa CS, Carrodore MM, Cipriano AL, Michelon CM, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Vilela MC, Teixeira AL. Circulating concentrations, cerebral output of the CINC-1 and blood-brain barrier disruption in Wistar rats after pneumococcal

meningitis induction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(8):2005-9.

Barichello T, Pereira JS, Savi GD, Generoso JS, Cipriano AL, Silvestre C, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Vilela MC, Teixeira AL. A kinetic study of the cytokine/chemokines levels and disruption of blood-brain barrier in infant rats after pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol*. 2011;233(1-2):12-7.

Barichello T, Savi GD, Silva GZ, Generoso JS, Bellettini G, Vuolo F, Petronilho F, Feier G, Comim CM, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Antibiotic therapy prevents, in part, the oxidative stress in the rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *Neurosci Lett*. 2010;478(2):93-6.

Barichello T, Silva GZ, Batista AL, Savi GD, Feier G, Comim CM, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Early antibiotic administration prevents cognitive impairment induced by meningitis in rats. *Neurosci Lett*. 2009;465(1):71-3.

Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*. 2004;84(3):869-901.

Bellac CL, Coimbra RS, Christen S, Leib SL. Inhibition of the kynurenine-NAD⁺ pathway leads to energy failure and exacerbates apoptosis in pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(11):1096-104.

Benveniste EN. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol*. 1992;52:106-53.

Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(3):144-54.

Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience*. 1998;86(4):1245-57.

Brasil. **Meningites » Aspectos epidemiológicos**. SAÚDE, M. D. 2013.

Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2007;3(3):186-91.

Brouwer MC, De Gans J, Heckenberg SG, Zwinderman AH, Van Der Poll T, Van De Beek D. Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(1):31-44.

Brouwer MC, Tunkel AR, Van De Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):467-92.

Carr DW e Scott JD, Blotting and band-shifting: techniques for studying protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci*. 1992;17(7):246-49.

Carrano A, Hoozemans JJ, Van Der Vies SM, Rozemuller AJ, Van Horsen J, De Vries HE. Amyloid Beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(5):1167-78.

Ceyhan M, Yildirim I, Balmer P, Borrow R, Dikici B, Turgut M, Kurt N, Aydogan A, Ecevit C, Anlar Y, Gulumser O, Tanir G, Salman N, Gurler N, Hatipoglu N, Hacimustafaoglu M, Celebi S, Coskun Y, Alhan E, Celik U, Camcioglu Y, Secmeer G, Gur D, Gray S. A prospective study of etiology of childhood acute bacterial meningitis, Turkey. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(7):1089-96.

Chen WW, Zhang X, Huang WJ. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep*. 2016;13(4):3391-6.

Chiavolini D, Pozzi G, Ricci S. Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):666-85.

Choi C. Bacterial meningitis in aging adults. *Clin Infect Dis*. 2001;33(8):1380-5.

Cockeran R, Theron AJ, Steel HC, Matlola NM, Mitchell TJ, Feldman C, Anderson R. Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils. *J Infect Dis.* 2001;183(4):604-11.

Coimbra RS, Voisin V, De Saizieu AB, Lindberg RL, Wittwer M, Leppert D, Leib SL. Gene expression in cortex and hippocampus during acute pneumococcal meningitis. *BMC Biol.* 2006;4(15):1741-7007.

Comim CM, Constantino LC, Barichello T, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive impairment in the septic brain. *Curr Neurovasc Res.* 2009;6(3):194-203.

Costerus JM, Brouwer MC, Bijlsma MW, Van De Beek D. Community-acquired bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2017;30(1):135-41.

Cox PA, Davis DA, Mash DC, Metcalf JS, Banack SA. Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain. *Proc Biol Sci.* 2016;283(1823):

Cunningham C, Hennessy E. Co-morbidity and systemic inflammation as drivers of cognitive decline: new experimental models adopting a broader paradigm in dementia research. *Alzheimers Res Ther.* 2015;7(1):015-0117.

Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4):742-80.

De Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schroder N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res.* 2005;156(1):139-43.

De Vries HE, Blom-Roosemalen MC, Van Oosten M, De Boer AG, Van Berkel TJ, Breimer DD, Kuiper J. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol.* 1996;64(1):37-43.

Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in

Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009;8(1):16-30.

Deane R, Singh I, Sagare AP, Bell RD, Ross NT, Larue B, Love R, Perry S, Paquette N, Deane RJ, Thiyagarajan M, Zarcone T, Fritz G, Friedman AE, Miller BL, Zlokovic BV. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid beta-mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1377-92.

Dent P. Crosstalk between ERK, AKT, and cell survival. *Cancer Biol Ther*. 2014;15(3):245-6.

Doran KS, Fulde M, Gratz N, Kim BJ, Nau R, Prasadarao N, Schubert-Unkmeir A, Tuomanen EI, Valentin-Weigand P. Host-pathogen interactions in bacterial meningitis. *Acta Neuropathol*. 2016;131(2):185-209.

Edelhauser HF, Rowe-Rendleman CL, Robinson MR, Dawson DG, Chader GJ, Grossniklaus HE, Rittenhouse KD, Wilson CG, Weber DA, Kuppermann BD, Csaky KG, Olsen TW, Kompella UB, Holers VM, Hageman GS, Gilger BC, Campochiaro PA, Whitcup SM, Wong WT. **Ophthalmic drug delivery systems for the treatment of retinal diseases: basic research to clinical applications**. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Nov;51(11):5403-20. doi: 10.1167/iovs.10-5392., ISBN 1552-5783 (Electronic) 0146-0404 (Linking).

Edmond K, Clark A, Korczak VS, Sanderson C, Griffiths UK, Rudan I. Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(5):317-28.

Engelen-Lee JY, Brouwer MC, Aronica E, Van De Beek D. Pneumococcal meningitis: clinical-pathological correlations (MeninGene-Path). *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4(26):016-0297.

Epidemiologia CND. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, 2005. ISBN 9788533410480. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=sCNgAAAAMAAJ> >.

Fang F, Lue LF, Yan S, Xu H, Luddy JS, Chen D, Walker DG, Stern DM, Yan S, Schmidt AM, Chen JX, Yan SS. RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Faseb j.* 2010;24(4):1043-55.

Fritz G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(12):625-32.

Gasparotto J, Girardi CS, Somensi N, Ribeiro CT, Moreira JCF, Michels M, Sonai B, Rocha M, Steckert AV, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Gelain DP. Receptor for advanced glycation endproducts mediates sepsis-triggered amyloid-beta accumulation, tau phosphorylation, and cognitive impairment. *J Biol Chem.* 2017;10(786756):786756.

Gerlofs-Nijland ME, Van Berlo D, Cassee FR, Schins RP, Wang K, Campbell A. Effect of prolonged exposure to diesel engine exhaust on proinflammatory markers in different regions of the rat brain. Part I. *Fibre Toxicol.* 2010;7(12):1743-8977.

Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015;386(9995):743-800.

Gong W, Zheng Y, Chao F, Li Y, Xu Z, Huang G, Gao X, Li S, He F. The anti-inflammatory activity of HMGB1 A box is enhanced when fused with C-terminal acidic tail. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010915234.

Gonzalez-Burgos G, Fish KN, Lewis DA. GABA neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia. *Neural Plast.* 2011;2011723184.

Grandgirard D, Leib SL. Meningitis in neonates: bench to bedside. *Clin Perinatol.* 2010;37(3):655-76.

Grandgirard D, Schurch C, Cottagnoud P, Leib SL. Prevention of brain injury by the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin in experimental

pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):2173-8.

Grandgirard D, Steiner O, Tauber MG, Leib SL. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol.* 2007;114(6):609-17.

Grimwood K, Anderson P, Anderson V, Tan L, Nolan T. Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. *Arch Dis Child.* 2000;83(2):111-6.

Gu Q, Wang B, Zhang XF, Ma YP, Liu JD, Wang XZ. Contribution of receptor for advanced glycation end products to vasculature-protecting effects of exercise training in aged rats. *Eur J Pharmacol.* 2014;741186-94.

Han SH, Kim YH, Mook-Jung I. RAGE: the beneficial and deleterious effects by diverse mechanisms of actions. *Mol Cells.* 2011;31(2):91-7.

Harashima S, Horiuchi T, Hatta N, Morita C, Higuchi M, Sawabe T, Tsukamoto H, Tahira T, Hayashi K, Fujita S, Niho Y. Outside-to-inside signal through the membrane TNF-alpha induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells. *J Immunol.* 2001;166(1):130-6.

Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(4):195-202.

Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol.* 2015;16(3):229-36.

Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(7):

Heras-Sandoval D, Perez-Rojas JM, Hernandez-Damian J, Pedraza-Chaverri J. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cell Signal.* 2014;26(12):2694-701.

Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med.* 1989;170(2):607-12.

Hohne C, Wenzel M, Angele B, Hammerschmidt S, Hacker H, Klein M, Bierhaus A, Sperandio M, Pfister HW, Koedel U. High mobility group box 1 prolongs inflammation and worsens disease in pneumococcal meningitis. *Brain.* 2013;136(Pt 6):1746-59.

Hong Y, Shen C, Yin Q, Sun M, Ma Y, Liu X. Effects of RAGE-Specific Inhibitor FPS-ZM1 on Amyloid-beta Metabolism and AGEs-Induced Inflammation and Oxidative Stress in Rat Hippocampus. *Neurochem Res.* 2016;41(5):1192-9.

Hoogman M, Van De Beek D, Weisfelt M, De Gans J, Schmand B. Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007;78(10):1092-6.

Howard M, O'garra A. Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today.* 1992;13(6):198-200.

Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, Beall BW, Bennett NM, Craig AS, Farley MM, Jorgensen JH, Lexau CA, Petit S, Reingold A, Schaffner W, Thomas A, Whitney CG, Harrison LH. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med.* 2009;360(3):244-56.

Hu X, Liou AK, Leak RK, Xu M, An C, Suenaga J, Shi Y, Gao Y, Zheng P, Chen J. Neurobiology of microglial action in CNS injuries: receptor-mediated signaling mechanisms and functional roles. *Prog Neurobiol.* 2014a;12060-84.

_____. Neurobiology of microglial action in CNS injuries: Receptor-mediated signaling mechanisms and functional roles. *Prog Neurobiol.* 2014b;

Ichiyama T, Isumi H, Yoshitomi T, Nishikawa M, Matsubara T, Furukawa S. NF-kappaB activation in cerebrospinal fluid cells from patients with meningitis. *Neurol Res.* 2002;24(7):709-12.

Iovino F, Brouwer MC, Van De Beek D, Molema G, Bijlsma JJ. Signalling or binding: the role of the platelet-activating factor receptor in invasive pneumococcal disease. *Cell Microbiol.* 2013;15(6):870-81.

Iovino F, Molema G, Bijlsma JJ. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, a putative receptor for the adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to the vascular endothelium of the blood-brain barrier. *Infect Immun.* 2014a;82(9):3555-66.

_____. *Streptococcus pneumoniae* Interacts with pIgR expressed by the brain microvascular endothelium but does not co-localize with PAF receptor. *PLoS One.* 2014b;9(5):

Iovino F, Orihuela CJ, Moorlag HE, Molema G, Bijlsma JJ. Interactions between blood-borne *Streptococcus pneumoniae* and the blood-brain barrier preceding meningitis. *PLoS One.* 2013;8(7):

Iovino F, Seinen J, Henriques-Normark B, Van Dijl JM. How Does *Streptococcus pneumoniae* Invade the Brain? *Trends Microbiol.* 2016;24(4):307-15.

Irazuzta J, Pretzlaff RK, Decourten-Myers G, Zemlan F, Zingarelli B. Dexamethasone decreases neurological sequelae and caspase activity. *Intensive Care Med.* 2005;31(1):146-50.

Irazuzta J, Pretzlaff RK, Zingarelli B. Caspases inhibition decreases neurological sequelae in meningitis. *Crit Care Med.* 2008;36(5):1603-6.

Irazuzta JE, Pretzlaff RK, Zingarelli B, Xue V, Zemlan F. Modulation of nuclear factor-kappaB activation and decreased markers of neurological injury associated with hypothermic therapy in experimental bacterial meningitis. *Crit Care Med.* 2002;30(11):2553-9.

Ji L, Zhao X, Lu W, Zhang Q, Hua Z. Intracellular Abeta and its pathological role in Alzheimer's disease: Lessons from cell and animal models. *Curr Alzheimer Res.* 2016;

Kamat PK, Rai S, Swarnkar S, Shukla R, Nath C. Molecular and cellular mechanism of okadaic acid (OKA)-induced neurotoxicity: a novel tool for Alzheimer's disease therapeutic application. *Mol Neurobiol.* 2014;50(3):852-65.

Kang J, Park EJ, Jou I, Kim JH, Joe EH. Reactive oxygen species mediate A beta(25-35)-induced activation of BV-2 microglia. *Neuroreport*. 2001;12(7):1449-52.

Kawai N, Kawanishi M, Okauchi M, Nagao S. Effects of hypothermia on thrombin-induced brain edema formation. *Brain Res*. 2001;895(1-2):50-8.

Kim KS. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(5):376-85.

_____. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(8):625-34.

Klein M, Koedel U, Pfister HW. Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy? *Prog Neurobiol*. 2006;80(6):269-80.

Kloek AT, Van Setten J, Van Der Ende A, Bots ML, Asselbergs FW, Valls Seron M, Brouwer MC, Van De Beek D, Ferwerda B. Exome Array Analysis of Susceptibility to Pneumococcal Meningitis. *Sci Rep*. 2016;6(29351):

Ko SY, Lin YP, Lin YS, Chang SS. Advanced glycation end products enhance amyloid precursor protein expression by inducing reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(3):474-80.

Koedel U, Bernatowicz A, Frei K, Fontana A, Pfister HW. Systemically (but not intrathecally) administered IL-10 attenuates pathophysiologic alterations in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol*. 1996;157(11):5185-91.

Koedel U, Klein M, Pfister HW. New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis*. 2010;23(3):217-23.

Koedel U, Scheld WM, Pfister H-W. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002;2(12):721-36.

Leal RB, Cordova FM, Herd L, Bobrovskaya L, Dunkley PR. Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;178(1):44-51.

Leib SL, Leppert D, Clements J, Tauber MG. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun.* 2000;68(2):615-20.

Leib SL, Tauber MG. Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am.* 1999;13(3):527-48.

Li S, Jin M, Koeglsperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. Soluble Abeta oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci.* 2011;31(18):6627-38.

Li XH, Lv BL, Xie JZ, Liu J, Zhou XW, Wang JZ. AGEs induce Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation. *Neurobiol Aging.* 2012;33(7):1400-10.

Lieberman AP, Pitha PM, Shin HS, Shin ML. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(16):6348-52.

Liechti FD, Grandgirard D, Leib SL. Bacterial meningitis: insights into pathogenesis and evaluation of new treatment options: a perspective from experimental studies. *Future Microbiol.* 2015;10(7):1195-213.

Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 2000;127(2):117-26.

Lindqvist D, Dhabhar FS, James SJ, Hough CM, Jain FA, Bersani FS, Reus VI, Verhoeven JE, Epel ES, Mahan L, Rosser R, Wolkowitz OM, Mellon SH. Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression. *Psychoneuroendocrinology.* 2017;76:197-205.

Lucas MJ, Brouwer MC, Van De Beek D. Neurological sequelae of bacterial meningitis. *J Infect.* 2016;73(1):18-27.

Mann A, Gondard E, Tampellini D, Milsted JaT, Marillac D, Hamani C, Kalia SK, Lozano AM. Chronic deep brain stimulation in an Alzheimer's disease mouse model enhances memory and reduces pathological hallmarks. *Brain Stimul.* 2017;23(17):30968-3.

Martin-Moreno AM, Reigada D, Ramirez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, De Ceballos ML. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol.* 2011;79(6):964-73.

Masouris I, Klein M, Dyckhoff S, Angele B, Pfister HW, Koedel U. Inhibition of DAMP signaling as an effective adjunctive treatment strategy in pneumococcal meningitis. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):017-0989.

Mcintyre PB, O'brien KL, Greenwood B, Van De Beek D. Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide. *Lancet.* 2012;380(9854):1703-11.

Meneghini V, Bortolotto V, Francese MT, Dellarole A, Carraro L, Terzieva S, Grilli M. High-mobility group box-1 protein and beta-amyloid oligomers promote neuronal differentiation of adult hippocampal neural progenitors via receptor for advanced glycation end products/nuclear factor-kappaB axis: relevance for Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2013;33(14):6047-59.

Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, Van Der Poll T, Van De Beek D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(3):557-91.

Moreillon P, Majcherczyk PA. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand J Infect Dis.* 2003;35(9):632-41.

Mueller JE, Yaro S, Ouedraogo MS, Levina N, Njanpop-Lafourcade BM, Tall H, Idohou RS, Sanou O, Kroman SS, Drabo A, Nacro B, Millogo A, Van Der Linden M, Gessner BD. Pneumococci in the African meningitis belt: meningitis incidence and carriage prevalence in children and adults. *PLoS One.* 2012;7(12):20.

Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med*. 2008;40(3):180-96.

Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun*. 2007;75(1):83-90.

Nwariaku FE, Liu Z, Zhu X, Turnage RH, Sarosi GA, Terada LS. Tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and the regulation of microvascular permeability. *Surgery*. 2002;132(2):180-5.

Orihuela CJ, Mahdavi J, Thornton J, Mann B, Wooldridge KG, Abouseada N, Oldfield NJ, Self T, Ala'aldeen DA, Tuomanen EI. Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1638-46.

Ostergaard C, Brandt C, Konradsen HB, Samuelsson S. Differences in survival, brain damage, and cerebrospinal fluid cytokine kinetics due to meningitis caused by 3 different *Streptococcus pneumoniae* serotypes: evaluation in humans and in 2 experimental models. *J Infect Dis*. 2004;190(7):1212-20.

Panza F, Seripa D, Solfrizzi V, Imbimbo BP, Lozupone M, Leo A, Sardone R, Gagliardi G, Lofano L, Creanza BC, Bisceglia P, Daniele A, Bellomo A, Greco A, Logroscino G. Emerging drugs to reduce abnormal beta-amyloid protein in Alzheimer's disease patients. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2016;21(4):377-91.

Paul R, Koedel U, Winkler F, Kieseier BC, Fontana A, Kopf M, Hartung HP, Pfister HW. Lack of IL-6 augments inflammatory response but decreases vascular permeability in bacterial meningitis. *Brain*. 2003;126(Pt 8):1873-82.

Polfliet MM, Zwijnenburg PJ, Van Furth AM, Van Der Poll T, Dopp EA, Renardel De Lavalette C, Van Kesteren-Hendrikx EM, Van Rooijen N, Dijkstra CD, Van Den Berg TK. Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *J Immunol*. 2001;167(8):4644-50.

Qing H, He G, Ly PT, Fox CJ, Staufenbiel M, Cai F, Zhang Z, Wei S, Sun X, Chen CH, Zhou W, Wang K, Song W. Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med.* 2008;205(12):2781-9.

Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(6):429-39.

Roesler R, Schroder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MB. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res.* 2003;975(1-2):207-13.

Roos KL, Van De Beek D. Bacterial meningitis. *Handb Clin Neurol.* 2010;9651-63.

Rusconi F, Parizzi F, Garlaschi L, Assael BM, Sironi M, Ghezzi P, Mantovani A. Interleukin 6 activity in infants and children with bacterial meningitis. The Collaborative Study on Meningitis. *Pediatr Infect Dis J.* 1991;10(2):117-21.

Salminen A, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. Inflammation in Alzheimer's disease: Amyloid- β oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. *Progress in Neurobiology.* 2009;87(3):181-94.

Sarnico I, Lanzillotta A, Benarese M, Alghisi M, Baiguera C, Battistin L, Spano P, Pizzi M. NF-kappaB dimers in the regulation of neuronal survival. *Int Rev Neurobiol.* 2009;85351-62.

Schwalm MT, Pasquali M, Miguel SP, Dos Santos JP, Vuolo F, Comim CM, Petronilho F, Quevedo J, Gelain DP, Moreira JC, Ritter C, Dal-Pizzol F. Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. *Mol Neurobiol.* 2014;49(1):380-5.

Sellner J, Tauber MG, Leib SL. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections. *Handb Clin Neurol.* 2010;961-16.

Sellner J, Täuber MG, Leib SL. Chapter 1 - Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections. In: KAREN, L. R. e

ALLAN, R. T. (Ed.). **Handbook of Clinical Neurology**: Elsevier, v. Volume 96, 2010. p.1-16. ISBN 0072-9752.

Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, Heneka MT. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol*. 2007;204(2):733-40.

Shamim D, Laskowski M. Inhibition of Inflammation Mediated Through the Tumor Necrosis Factor alpha Biochemical Pathway Can Lead to Favorable Outcomes in Alzheimer Disease. *J Cent Nerv Syst Dis*. 2017;9(1179573517722512):

Shen C, Ma Y, Zeng Z, Yin Q, Hong Y, Hou X, Liu X. RAGE-Specific Inhibitor FPS-ZM1 Attenuates AGEs-Induced Neuroinflammation and Oxidative Stress in Rat Primary Microglia. *Neurochem Res*. 2017;42(10):2902-11.

Shi C, Yi D, Li Z, Zhou Y, Cao Y, Sun Y, Chui D, Guo X. Anti-RAGE antibody attenuates isoflurane-induced cognitive dysfunction in aged rats. *Behav Brain Res*. 2017;322(Pt A):167-76.

Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:367-88.

Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2000;26(1):139-44.

Smith SL, Hall ED. Mild pre- and posttraumatic hypothermia attenuates blood-brain barrier damage following controlled cortical impact injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1996;13(1):1-9.

Somand D, Meurer W. Central nervous system infections. *Emerg Med Clin North Am*. 2009;27(1):89-100.

Srikanth V, Maczurek A, Phan T, Steele M, Westcott B, Juskiw D, Munch G. Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2011;32(5):763-77.

Sriram K, O'callaghan JP. Divergent roles for tumor necrosis factor- α in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007;2(2):140-53.

Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier. *Curr Neuropharmacol.* 2008;6(3):179-92.

Su F, Bai F, Zhou H, Zhang Z. Microglial toll-like receptors and Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun.* 2016;52:187-98.

Sun X, He G, Qing H, Zhou W, Dobie F, Cai F, Staufenbiel M, Huang LE, Song W. Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(49):18727-32.

Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T. Transforming growth factor- β suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J Immunol.* 1993;151(4):2150-8.

Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett.* 2003;141:105-12.

Takeshita Y, Shibata N, Kasanuki K, Nagata T, Shinagawa S, Kobayashi N, Ohnuma T, Suzuki A, Kawai E, Takayama T, Nishioka K, Motoi Y, Hattori N, Nakayama K, Yamada H, Arai H. Genetic association between RAGE polymorphisms and Alzheimer's disease and Lewy body dementias in a Japanese cohort: a case-control study. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2017;32(12):1241-6.

Takuma K, Fang F, Zhang W, Yan S, Fukuzaki E, Du H, Sosunov A, Mckhann G, Funatsu Y, Nakamichi N, Nagai T, Mizoguchi H, Ibi D, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Yamada K, Yan SS. RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid- β and neuronal dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(47):20021-6.

Tang D, Kang R, Cao L, Zhang G, Yu Y, Xiao W, Wang H, Xiao X. A pilot study to detect high mobility group box 1 and heat shock protein 72 in cerebrospinal fluid of pediatric patients with meningitis. *Crit Care Med.* 2008;36(1):291-5.

Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE, Zell ER, Lynfield R, Hadler JL, Harrison LH, Farley MM, Reingold A, Bennett NM, Craig AS, Schaffner W, Thomas A, Lewis MM, Scallan E, Schuchat A. Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. *N Engl J Med*. 2011;364(21):2016-25.

Tobon-Velasco JC, Cuevas E, Torres-Ramos MA. Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF- κ B pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13(9):1615-26.

Van De Beek D, De Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med*. 2004;351(18):1849-59.

Van De Beek D, Schmand B, De Gans J, Weisfelt M, Vaessen H, Dankert J, Vermeulen M. Cognitive impairment in adults with good recovery after bacterial meningitis. *J Infect Dis*. 2002;186(7):1047-52.

Van Zoelen MA, Schmidt AM, Florquin S, Meijers JC, De Beer R, De Vos AF, Nawroth PP, Bierhaus A, Van Der Poll T. Receptor for advanced glycation end products facilitates host defense during *Escherichia coli*-induced abdominal sepsis in mice. *J Infect Dis*. 2009;200(5):765-73.

Waage A, Halstensen A, Shalaby R, Brandtzaeg P, Kierulf P, Espevik T. Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med*. 1989;170(6):1859-67.

Waites CL, Garner CC. Presynaptic function in health and disease. *Trends Neurosci*. 2011;34(6):326-37.

Wang Y, Kong L, Li W, Zhang K, Shen F, Zhou H, Sun G. [Effects and mechanisms of different frequencies of electroacupuncture for learning and memory ability of Alzheimer's rats]. *Zhongguo Zhen Jiu*. 2017;37(6):629-36.

Wellmer A, Gerber J, Ragheb J, Zysk G, Kunst T, Smirnov A, Bruck W, Nau R. Effect of deficiency of tumor necrosis factor alpha or both of its

receptors on *Streptococcus pneumoniae* central nervous system infection and peritonitis. *Infect Immun.* 2001;69(11):6881-6.

Wuwongse S, Cheng SS, Wong GT, Hung CH, Zhang NQ, Ho YS, Law AC, Chang RC. Effects of corticosterone and amyloid-beta on proteins essential for synaptic function: implications for depression and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2245-56.

Zhang J, Zhen YF, Pu Bu Ci R, Song LG, Kong WN, Shao TM, Li X, Chai XQ. Salidroside attenuates beta amyloid-induced cognitive deficits via modulating oxidative stress and inflammatory mediators in rat hippocampus. *Behav Brain Res.* 2013;24470-81.

Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.

Zhang M, Wang Y, Qian F, Li P, Xu X. Hypericin inhibits oligomeric amyloid beta₄₂-induced inflammation response in microglia and ameliorates cognitive deficits in an amyloid beta injection mouse model of Alzheimer's disease by suppressing MKL1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;481(1-2):71-6.

Zilka N, Kazmerova Z, Jadhav S, Neradil P, Madari A, Obetkova D, Bugos O, Novak M. Who fans the flames of Alzheimer's disease brains? Misfolded tau on the crossroad of neurodegenerative and inflammatory pathways. *J Neuroinflammation.* 2012;9(47):1742-2094.

Zong H, Madden A, Ward M, Mooney MH, Elliott CT, Stitt AW. Homodimerization is essential for the receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 2010;285(30):23137-46.

Zwijnenburg PJ, Van Der Poll T, Roord JJ, Van Furth AM. Chemotactic factors in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis. *Infect Immun.* 2006;74(3):1445-51.

ANEXO(S)

ANEXO A – Certificado de aprovação do CEUA



Animal Welfare Committee

7080 Francis Street, Suite 1870
Houston, Texas 77030**APPROVAL – ANIMAL PROTOCOL: NON-USDA SPECIES**

January 20, 2017

AWC-16-0106 – “Brain Infection and Alzheimer’s Disease: Possible Role of A β -RAGE Axis”

PI: Tatiana Barichello, PhD

SPECIES: Rat

PAIN CLASSIFICATION: D

NUMBER OF ANIMALS APPROVED: 242

FUNDING AGENCY: The University of Texas Health Science Center-Houston

PROVISIONS: NONE

APPROVED: Designated Member Review

ORIGINAL APPROVAL DATE: 01/20/2017

EXPIRATION DATE: 12/31/2019

CHAIRPERSON: Diane L. Bick, Ph.D.

Approval is given to initiate this protocol for the use of animals, contingent upon compliance with any other provisions noted above.

REVISIONS REQUIRED BY THE AWC – If the AWC requires that revisions be made to proposed animal manipulations in a grant that is covered by this protocol, the PI must submit the revisions to the funding agency as soon as the revised protocol/materials have been approved by the AWC.

CHANGES – Modifications to this protocol must be submitted for review and approval *prior* to implementation. Minor changes, e.g. dosing regimens, methods of euthanasia, anesthesia, surgery, new personnel, etc. must be submitted on a Change Request form available on the AWC/CLAMC [website](#). If changes are extensive or involve another species, a new Animal Protocol must be submitted.

ADVERSE EVENTS/UNANTICIPATED PROBLEMS - It is the responsibility of the PI to report to the veterinarian and the AWC any unexpected outcomes (abnormal phenotypes, increased toxicity of substance, surgical complications, etc.) that have resulted in jeopardizing the welfare of the animals in excess of what was explained in the protocol. An Adverse Event/Unanticipated

Problems/Protocol Deviation form is available on the AWC/CLAMC [website](#). Please complete and submit to awc@uth.tmc.edu.

PROTOCOL DEVIATIONS - It is the responsibility of the PI to report any unapproved deviations in the protocol to the AWC as soon as discovered. Such deviations may include; personnel not approved on protocol manipulating animals, breeding strains that were not approved on protocol; changing method of anesthesia without approval. Please complete an Adverse Event/Unanticipated Problem/Protocol Deviation form available on the AWC/CLAMC [website](#) and submit to the awc@uth.tmc.edu.

LOCATIONS FOR HOUSING/MANIPULATION - Locations for the housing and manipulation of animals are contingent upon the health status of the animals, facility barrier level, containment level, and the availability of space. While appropriate housing of all animals is managed by CLAMC, housing decisions for the IMM are made in consultation with the IMM Vivarium Committee. The locations for AWC-approved animal manipulations outside of the barrier but within IMM facility must be endorsed by the IMM Vivarium committee since such activities may compromise the integrity of the barrier.

GRANT RENEWALS/SUBMISSION TO ANOTHER FUNDING AGENCY – Submit a completed Change Request form and a copy of the grant to the AWC office. Include the first page of the new grant, the abstract, and the section describing the animal work. All animal work stated in the grant must be covered by the approved animal protocol.

ANIMAL PROTOCOL REVIEW NUMBER – Animals purchased with the number listed above may be used only for the protocol(s) approved under this number.

PERSONNEL TRAINING- It is your responsibility to ensure that all personnel working with animals are adequately trained. To register individuals for the required training go to Animal Training [website](#).

ANEXO B – Certificado de aprovação do CEUA



**Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Papel da via β -amilóide-RAGE na disfunção cognitiva tardia na meningite bacteriana", Protocolo nº 021/2015-2 sob a responsabilidade de Josiane Budni equipe: Amanda Valnier Steckert, Jaqueline S. Generoso, Lufiana R. Simões, Ana Paula Moreira, Diogo Domingui, Débora B. Tomaz, Jéssica A. Goularte, Cássia P. Rafael, Cristiano Julio Faller, Gustavo Sangiogo da Silva, Monique Michels, Felipe Dal Pizzol, Tatiana Barichello e João Luciano de Quevedo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Vigência do Projeto	03/09/2015 a 20/12/2016
Espécie/Inhagem	Ratos Wistar
Nº. De animais	158
Peso/Idade	60 dias
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 021/2015-2

Principal Investigator: Josiane Budni.

Researchers: Amanda Valnier Steckert, Jaqueline S. Generoso, Lufiana R. Simões, Ana Paula Moreira, Diogo Domingui, Débora B. Tomaz, Jéssica A. Goularte, Cássia P. Rafael, Cristiano Julio Faller, Gustavo Sangiogo da Silva, Monique Michels, Felipe Dal Pizzol, Tatiana Barichello e João Luciano de Quevedo.

Project title: Role of β -amyloid-RAGE pathway in the late cognitive impairment in bacterial meningitis.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 08 de setembro de 2015.


JAIRO JOSÉ ZOCHE
 Coordenador da CEUA