

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

**GLAUCO DANIELLE FAGUNDES**

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE AMBIENTE ENRIQUECIDO  
NOS PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E  
COMPORTAMENTAIS EM UM MODELO EXPERIMENTAL  
DE MENINGITE PNEUMOCÓCICA NEONATAL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana  
Barichello

**CRICIÚMA  
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F156e Fagundes, Glauco Danielle.

Efeito da utilização de ambiente enriquecido nos parâmetros neuroquímicos e comportamentais em um modelo experimental de Meningite Pneumocócica neonatal / Glauco Danielle Fagundes ; orientadora: Tatiana Barichello. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2015.

85 p : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul

Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2015.

1. Meningite pneumocócica. 2. Citocinas. 3. Quimiocinas. 4. Estresse oxidativo. 5. Fator neurotrófico derivado do cérebro. I. Título.

CDD. 22<sup>a</sup> ed. 616.82



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

---

## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Glauco Danielle Fagundes** sob o título **“Efeito da utilização de ambiente enriquecido nos parâmetros neuroquímicos e comportamentais em um modelo experimental meningite pneumocócica neonatal”**, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Tese.


Criciúma, SC, 04 de fevereiro de 2016.

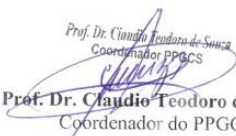
  
Prof.ª Dr.ª **ALEXANDRA IOPPI ZUGNO**  
Membro Relator - UNESC

  
Prof. Dr. **FELIPE DAL PIZZOL**  
Membro Interno - UNESC

  
Prof.ª Dr.ª **FABRICIA PETRONILHO**  
Membro Externo - UNISUL

  
Prof. Dr. **ADAIR DOS SANTOS**  
Membro Externo - UFSC

  
Prof.ª Dr.ª **Tatiana Barichello**  
Orientadora

  
Prof. Dr. **Claudio Teodoro de Souza**  
Coordenador do PPGCS



## **FOLHA INFORMATIVA**

A tese de doutorado foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Microbiologia Experimental e Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.



A minha esposa, filho e filha, que me acompanham em todos os momentos.

Muito obrigado!





## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por estar sempre presente em minha vida, me guiando, nos momentos mais difíceis.

À Prof. Dra. Tatiana Barichello, pela orientação desta dissertação, que mesmo de longe, acompanhou e supervisionou todas as etapas deste trabalho. Obrigada pela oportunidade de participar no seu grupo de pesquisa.

A todos integrantes do laboratório pela ajuda, troca de experiências e todas horas que passamos juntos.

A todos, muito obrigado!



*“Eu aprendi que todos querem viver  
no topo da montanha, mas toda  
felicidade e crescimento ocorre  
quando você esta escalando-a.”*

*Albert Einstein*



## RESUMO

Meningite neonatal é uma doença caracterizada pela inflamação das meninges, ocorrendo geralmente nos primeiros 28 dias de vida. Infecções por *Streptococcus pneumoniae*, meningite e/ou sepse, em recém-nascidos está associada com a ruptura prolongada de membranas, doença materna e prematuridade. Apresenta alta taxa de mortalidade e 50% dos sobreviventes apresentam algum tipo de deficiência. O ambiente enriquecido pode ser utilizado na tentativa de minimizar o dano cognitivo, já que é uma abordagem não farmacológica e tem sido demonstrando sua ação na plasticidade cerebral, neurogênese e aumento da expressão do fator neurotrófico, bem como proteção contra os efeitos de lesões cerebrais. O objetivo deste trabalho foi avaliar os mediadores inflamatórios, integridade da barreira hematoencefálica e parâmetros comportamentais em ratos Wistar neonatos submetidos ao ambiente enriquecido após indução da meningite por *Streptococcus pneumoniae*. Os níveis de citocinas tiveram um aumento antes da ruptura da barreira hematoencefálica, que ocorreu no hipocampo em 18 horas e no córtex em 12 horas após a indução da meningite pneumocócica. Os níveis de TBARS aumentaram em 12 h e 24 h no córtex sem ocorrer alteração no hipocampo. A carbonilação de proteínas foi aumentada em 24 h e 48 h no hipocampo, sem ocorrer alteração no córtex. Houve aumento na atividade da SOD no hipocampo em 12 h e 48 h. Ocorreu aumento da Catalase em 48 h no hipocampo e no córtex. Os níveis de atividade da Mieloperoxidase não alteraram no hipocampo e no córtex após a indução da meningite. Nos testes comportamentais, 60 dias após a indução da meningite, o grupo meningite não mostrou diferença no desempenho entre as sessões treino e teste na atividade de campo aberto, sugerindo prejuízo da memória de habituação. No grupo meningite/ambiente enriquecido, o desempenho foi significativamente diferente, mostrando preservação da memória de habituação. Natarefa de esquiva inibitória, não houve diferença comportamental entre as sessões treino e teste no grupo meningite, demonstrando comprometimento da memória aversiva. Por outro lado, ocorreram diferenças no desempenho do grupo meningite/ambiente enriquecido, demonstrando preservação da memória aversiva. Tanto no grupo meningite, quanto no meningite/ambiente enriquecido, os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), interleucina-4 (IL-4) e IL-10 foram aumentados no hipocampo e no líquido cefalorraquidiano (LCR). Os dados sugerem que o ambiente enriquecido é uma terapia não



invasiva, que permite a recuperação de déficits de memória causados por meningite neonatal.

**Palavras-chave:** meningite pneumocócica; ambiente enriquecido; citocinas; BDNF





## ABSTRACT

Neonatal meningitis is a disease characterized by inflammation of the meninges, usually occurring within the first 28 days of life. *Streptococcus pneumoniae* infections, meningitis and / or sepsis in newborns is associated with prolonged rupture of the membranes, premature birth and maternal disease. Has a high mortality rate and 50% of survivors have some form of disability. The enriched environment can be used in an attempt to minimize the cognitive damage, since it is a non-pharmacological approach and has been demonstrating its effect on brain plasticity, neurogenesis and increased neurotrophic factor expression and protection against the effects of brain injury. The objective of this study was to evaluate the inflammatory mediators, integrity of the blood brain barrier and behavioral parameters in rats neonates undergoing enriched environment after induction of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. Cytokine levels were increased prior to rupture of the blood-brain barrier, which occurred in the hippocampus and cortex for 18hours at 12 hours after induction of pneumococcal meningitis. TBARS levels increased at 12 h and 24 h in the cortex with no change occurs in the hippocampus. The protein carbonylation was increased to 24 h and 48 h in the hippocampus, no change occurs in the cortex. An increase in the SOD activity in hippocampus at 12 h and 48 h. There was an increase of catalase at 48 h in the hippocampus and cortex. The myeloperoxidase activity levels did not change in cortex and hippocampus after the induction of meningitis. In behavioral tests, 60 days after the induction of meningitis, meningitis group showed no difference in the training sessions between operations performance and testing in open field activity, suggesting loss of habituation. In the group meningitis/enriched environment, performance was significantly different, showing preservation of habituation. In the inhibitory avoidance task, no behavioral difference between training sessions and test the meningitis group, demonstrating commitment aversive memory. Moreover, significant differences in the performance group meningitis/enriched environment, showing the preservation of aversive memory. The group meningitis and meningitis/enriched environment, neurotrophic factor levels derivative (BDNF), interleukin-4 (IL-4) and IL-10 were increased in the hippocampus and cerebral spinal fluid (CSF). The data suggest that enhanced environment is a non-invasive therapy that enables recovery of memory deficits caused by neonatal meningitis.



**Keywords:** pneumococcal meningitis; environmental enrichment; cytokines; BDNF



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Linha de tempo representando o desenho experimental para dosagens de citocinas, quimiocinas e CINC-1. ....	41
<b>Figura 2:</b> Linha de tempo representando o desenho experimental para avaliação da integridade da BHE. ....	42
<b>Figura 3:</b> Linha de tempo representando o desenho experimental para avaliação do estresse oxidativo e atividade da mieloperoxidase. ....	43
<b>Figura 4:</b> Linha de tempo representando o desenho experimental para testes comportamentais. ....	45
<b>Figura 5:</b> Ambiente enriquecido. ....	46
<b>Figura 6:</b> Teste de habituação ao campo aberto. ....	47
<b>Figura 7:</b> Teste de esquiva inibitória. ....	48
<b>Figura 8:</b> Avaliação dos níveis de CINC-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e expressão de TNF- $\alpha$ no hipocampo após a indução da meningite por <i>S. pneumoniae</i> 1. ....	51
<b>Figura 9:</b> Avaliação dos níveis de CINC-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e expressão de TNF- $\alpha$ no córtex cerebral após a indução da meningite por <i>S. pneumoniae</i> . ....	52
<b>Figura 10:</b> Dano oxidativo no cérebro de rato durante o desenvolvimento de meningite pneumocócica em 6, 12, 24 e 48 horas após a indução. ....	53
<b>Figura 11:</b> Atividade enzimática cérebro de rato durante o desenvolvimento de meningite pneumocócica em 6, 12, 24 e 48 horas após a indução. ....	54
<b>Figura 12:</b> Atividade Mieloperoxiase no hipocampo e córtex dos animais em 6, 12, 24 e 48 horas após a indução da meningite pneumocócica. ....	55
<b>Figura 13:</b> Integridade da BHE investigada utilizando o extravasamento do corante azul de Evans extravasamento no hipocampo e no córtex após a indução de meningite por <i>S. pneumoniae</i> . ....	56
<b>Figura 14:</b> Habituação à tarefa de campo aberto em ratos Wistar adultos com 60 dias após a indução da meningite pneumocócica durante a infância. ....	57
<b>Figura 15:</b> Tarefa de esquiva inibitória em ratos Wistar adultos com 60 dias após a indução da meningite pneumocócica durante a infância. ...	58
<b>Figura 16:</b> Avaliação dos níveis de CINC-1, BDNF, IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ no hipocampo dos animais sobreviventes a meningite na infância. ....	59
<b>Figura 17:</b> Avaliação da concentração de BDNF e TNF- $\alpha$ no líquido cefalorraquidiano dos animais sobreviventes a meningite na infância. ...	60



## LISTA DE ABREVIATURAS

AE: Ambiente enriquecido;

AIF: Fator de indução a apoptose (do inglês, *apoptosis induction factor*).

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*);

BHE: Barreira Hematoencefálica;

CAT: Catalase;

CEUA: Comissão de Ética em Uso de Animais;

CINC-1: Citocina Quimiotática Indutora de Neutrófilos tipo 1 (do inglês, *Cytokine-induced neutrophil chemoattractant type 1*);

DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*);

DNPM: Desenvolvimento Psicomotor;

ELISA: Ensaio Imunoenzimático (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*);

ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio;

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio;

Fe: Ferro

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogênio;

IL: Interleucina;

LCR: Líquido Cefalorraquidiano;

MIP-2: Endopeptidase Mitocondrial-2 (do inglês: *mitochondrial*)

MP: Metaloproteínas ;

MPO: Mieloperoxidase (do inglês, *Myeloperoxidase*);

NM: Nanometro;





NF- $\kappa$ B: Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*);

NGF: Fator de Crescimento Neuronal (do inglês, *neuronal growth factor*);

NL-RP3: Receptores Nodlike- P3 (do inglês, *Nodlike receptor 3*);

NOD: Domínio de ligação de nucleotídeos e oligomerização (do inglês, *nucleotide binding oligomerization domain*);

NT-3: Neurotrofina-3;

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Ânion Superóxido;

OCl<sup>-</sup>: Hipoclorito;

OH<sup>-</sup>: Radical hidroxila;

ONOO<sup>-</sup>: Peroxinitrito;

PAF: Fator de Agregação Plaquetária (do inglês, *Platelet aggregation factor*);

PAMP: Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*);

*S.pneumoniae: Streptococcus pneumoniae*;

SINAN: Sistema de Informação de Agravantes de Notificação;

SN: Sistema Nervoso;

SNC: Sistema Nervoso Central;

SOD: Superóxido Dismutase;

SSPS: Pacote Estatístico de Ciências Sociais (do inglês, *Statistical Package for Social Sciences*);

TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês, *Thiobarbituric acidre active substances*);

TL: Tolllike;



TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês, *Tumor Necrosis factor Alpha*).



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
1.1 MENINGITE.....	29
1.2 EPIDEMIOLOGIA .....	29
1.3 ASPÉCTOS CLÍNICOS .....	31
1.4 FISIOPATOLOGIA .....	32
1.5 INFLAMAÇÃO NEURONAL .....	33
1.6 ESTRESSE OXIDATIVO .....	34
1.7 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA .....	35
1.8 AMBIENTE ENRIQUECIDO .....	36
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA .....	39
3.2 ORGANISMO INFECTANTE .....	39
3.3 PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DA MENINGITE .....	39
3.4 PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DA MENINGITE .....	39
3.4 TESTES BIOQUÍMICOS .....	40
<b>3.4.1 Dosagens de citocinas, quimiocinas e CINC-1 .....</b>	<b>40</b>
<b>3.4.2 Permeabilidade da barreira hematoencefálica .....</b>	<b>41</b>
<b>3.4.3 Dano oxidativo e defesa enzimática .....</b>	<b>43</b>
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	44
<b>3.5.1 Ambiente enriquecido .....</b>	<b>45</b>
<b>3.5.2 Habituação ao campo aberto.....</b>	<b>46</b>
<b>3.5.3 Esquiva innibitória .....</b>	<b>47</b>
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>80</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MENINGITE

Meningite neonatal é uma doença caracterizada pela inflamação das meninges que ocorre nos primeiros 28 dias de vida. Esta doença continua sendo uma causa importante de morbidade e mortalidade em recém-nascidos (De Louvois et al., 2005; Kim, 2010). O microrganismo causador de meningite neonatal tende a variar de acordo com o país, no entanto um número relativamente pequeno de agentes patogênicos como *Streptococcusagalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeriamonocytogenes* e *Streptococcus pneumoniae* são responsáveis pela maioria dos casos (Kim, 2010). *S. agalactiae* implica em até 50% dos casos, bactérias Gram negativos causam 30-40% dos casos (Dawson et al., 1999), *S. pneumoniae* 6% dos casos e *L. monocytogenes* 5% (Okike et al., 2014b). A meningite pneumocócica é a mais grave dentre as meningites bacterianas. Estudo anterior sugere que a infecção invasiva por *S. pneumoniae*, meningite e sepse, em neonatos está associada com a ruptura prolongada das membranas, a colonização maternal/doença, prematuridade e elevada mortalidade (50%) (Hoffman e Maldonado, 2008). A mortalidade na meningite em pacientes não tratados se aproxima de 100% (Kim, 2010) e 50% dos casos tratados tem algum tipo de deficiência (Okike et al., 2014a).

Sequelas neurológicas de longo prazo são encontradas em pacientes que sobrevivem à meningite bacteriana durante a infância, incluindo a surdez, déficits sensório-motor, distúrbios convulsivos e deficiências cognitivas tais como déficits de aprendizagem e memória (Meli et al., 2002).

Em modelos animais de meningite o tratamento adjuvante com antioxidante (Barichello et al., 2012e), com canabidiol, (Barichello et al., 2012a) ou dexametasona (Barichello et al., 2011) tem demonstrado prevenir disfunção cognitiva, prevenção de dano a memória, redução dos níveis de TNF- $\alpha$ , formação de malondialdeído e carbonilação de proteínas, diminuição da integridade celular, aumentando ainda os níveis de superóxido mitocondrial.

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

A meningite bacteriana representa uma patologia muito importante em todo o mundo, e é considerada uma doença grave e com alta incidência de mortalidade e morbidade (Wenger et al., 1990). A

taxa de letalidade para países desenvolvidos é de 4,5%, enquanto que em países com baixa renda varia de 15 a 50% (Molyneux et al., 2002; Brandt, 2010a).

A taxa média de letalidade mundial é 43%. Em um estudo de O'Brien e colaboradores (2009) para a meningite pneumocócica em crianças menores de cinco anos de idade, a taxa de incidência global foi de 17 casos para 100.000 habitantes (38 para a África) e a taxa média de letalidade foi de 59% (73% para a África). No mundo, 65 mil crianças morreram de meningite pneumocócica, sendo que 31.700 dessas mortes foram na África (O'Brien et al., 2009).

A mortalidade dos pacientes não tratados se aproxima de 100% e 50% dos casos tratados sofrem com alguma forma de seqüela, podendo incluir déficit de aprendizagem, surdez, retardo mental e hidrocefalia. Os recém-nascidos sobreviventes permanecem com alto risco de seqüelas neurológicas e deficiência ao longo da vida, como resultado do dano do processo infeccioso aos seus cérebros em desenvolvimento (Polin e Harris, 2001; De Louvois et al., 2005).

No Brasil em 2011, foram confirmados 8.676 casos de meningite em todas as faixas etárias, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Desses, 37% foram de origem bacteriana, 41% viral, 17% não especificada e 3% por outra etiologia. Entre os casos de meningite bacteriana, 35% foram meningocócica, 43% como meningites por espécies bacterianas não especificadas e 15% como meningite pneumocócica. Em menores de dois anos de idade foram confirmados 1.570 casos de meningites: 37% foram de origem bacteriana, 41% viral, 19% não especificada e 1% de meningite por outra etiologia. Entre os casos de meningite bacteriana, 34% foram meningite meningocócica, 47% como meningites por outras bactérias e 13% como meningite pneumocócica (SVS, 2012).

As crianças são particularmente vulneráveis à meningite bacteriana, dois terços das mortes por meningite em países de baixa renda ocorrem entre crianças menores de 15 anos de idade (Kim, 2010). Nos recém-nascidos com bacteremia a meningite bacteriana ocorre em até 15%. Entre as crianças com doença invasiva estreptocócica de 5 a 10%, apresentam meningite com início precoce e cerca de 25% com início tardio (Jordan et al., 2008; Phares et al., 2008).

A incidência documentada de meningite bacteriana em recém-nascidos (RN <1 mês) diminuiu substancialmente desde os anos 1970, em grande parte devido à prevenção através da triagem materna para estreptococos do grupo B e antimicrobianos intraparto, avaliação rápida



dos bebês em unidades de cuidados intensivos neonatais início precoce do tratamento (Verani et al., 2010).

### 1.3 ASPÉCTOS CLÍNICOS

O quadro clínico na meningite neonatal geralmente é indistinguível da sepse neonatal sem meningite. Os sinais clínicos mais comumente relatados são a instabilidade na temperatura, irritabilidade ou letargia e má alimentação ou vômitos. A Meningite neonatal é categorizada como precoce quando apresenta sinais de infecção até 72 horas de vida, e de início tardia quando os sintomas surgem após 72 horas de vida (Cohen-Wolkowicz et al., 2009).

Países desenvolvidos apresentam uma incidência de 0,3/1000 e mortalidade de 10% - 15% para meningite neonatal, enquanto os países em desenvolvimento apresentam uma incidência de 0,8 - 6,1 /1000 e mortalidade de 40% - 58% (Furyk et al., 2011; Gaschignard et al., 2011; Okike et al., 2014a).

Os fatores preditivos de morte ou graves sequelas de meningite bacteriana incluem: baixo peso ao nascer (peso ao nascer < 2.500 g) ou parto prematuro (< 37 semanas de gestação), uma história de sintomas por mais de 24 horas antes da hospitalização, leucopenia (leucócitos < 5000/ $\mu$ L) e neutropenia na apresentação, convulsões que ocorrem mais de 72 horas após a internação, déficits neurológicos focais a exigência de suporte ventilatório mecânico ou inotrópicos e esterilização retardada do líquido cefalorraquidiano (LCR)(Overall, 1970; Unhanand et al., 1993; Klinger et al., 2000; May et al., 2005; Greenberg et al., 2011).

A avaliação de recém-nascidos com suspeita de septicemia ou meningite deve incluir uma revisão da história pré-natal, parto e exame físico completo. O quadro clínico de meningite bacteriana no recém-nascido é inespecífico, e os recém-nascidos com suspeita de meningite bacteriana devem ser submetidos a uma avaliação laboratorial para sepse, que inclui: hemograma completo com diferencial, hemocultura, cultura de urina (se > 6 dias de idade) e punção lombar (para o LCR:contagem de células, proteínas, glicose, coloração de Gram, e cultura) (Nizet, 2011).

O diagnóstico laboratorial é feito pela identificação do patógeno bacteriano a partir do LCR por cultura e/ou visualização por coloração de Gram. As características do LCR que indicam infecção bacteriana incluem:

- Aumento de glóbulos brancos (tipicamente  $> 1000/\mu\text{L}$ , mas pode ser menor, especialmente com organismos Gram-positivos), com predomínio de neutrófilos;

- Concentração de proteínas do LCR elevada ( $> 150 \text{ mg/dL}$  em bebês prematuros e  $> 100 \text{ mg/dL}$  em bebês nascidos a termo);

- Concentração de glicose diminuída ( $< 20 \text{ mg/dl}$  [ $1,1 \text{ mmol/L}$ ] de pré-termo e  $< 30 \text{ mg/dl}$  [ $1,7 \text{ mmol/L}$ ] em crianças a termo);

As hemoculturas muitas vezes são positivas para o mesmo organismo como a cultura LCR, mas pode ser negativa em até 30 ou 38% (Wiswell et al., 1995; Stoll et al., 2004; Garges et al., 2006).

O atendimento inicial para todos os recém-nascidos com meningite devem ser fornecidos em um ambiente de cuidados intensivos. Embora não existam dados para quantificar o impacto, a oxigenação adequada, prevenção de hipoglicemia, terapia anticonvulsivante eficaz, o controle da hipertensão intracraniana, e prevenção de oscilações do fluxo sanguíneo cerebral são considerados peças fundamentais do gerenciamento de recém-nascidos com meningite bacteriana (Saez-Llorens, 2004).

Para o tratamento, se a avaliação inicial do LCR é sugestiva de meningite bacteriana, é indicado antimicrobiano de amplo espectro que têm penetração adequada no LCR e deve ser iniciado tão cedo quanto possível (Saez-Llorens, 2004).

O acompanhamento para os pacientes sobreviventes de meningite neonatal inclui o monitoramento da audição, monitoramento da acuidade visual e avaliações periódicas do estado de desenvolvimento neuropsicomotor (Estripeaut, 2009).

#### 1.4 FISIOPATOLOGIA

*S. pneumoniae* é um microrganismo encapsulado com características distintas que lhe permitem invadir o hospedeiro, colonizar a mucosa e alcançar a circulação sanguínea (Somand e Meurer, 2009).

A barreira hematoencefálica (BHE) é responsável pela manutenção do microambiente neuronal através da regulação da passagem de moléculas para dentro e fora do cérebro, protegendo-o de microrganismos e toxinas presentes na corrente sanguínea e mantendo a homeostase do sistema nervoso central (SNC) (Weiss et al., 2009).

No SNC, a bactéria multiplica-se rapidamente, e ao mesmo tempo ocorre lise bacteriana com liberação de compostos altamente imunogênicos, como o ácido teicóico e peptidoglicano (Koedel et al.,

2010). Os componentes bacterianos são, então, reconhecidos por receptores do tipo Toll-like (TL) ou receptores intracelulares tais como NOD1/2 e NLRP3 que ativam o fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), conseqüentemente ocorre à liberação de moléculas mediadoras pró-inflamatórias e outras substâncias pró-inflamatórias do hospedeiro, como prostaglandinas, metaloproteinases (MMP), mieloperoxidase (MPO) e espécies reativas de oxigênio (ERO) (Van De Beek, 2009).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e a interleucina beta (IL-1 $\beta$ ), desencadeiam uma resposta inflamatória de fase aguda, subsequentemente, outros mediadores são liberados, como interleucina-6 (IL-6), IL-8, fator de agregação plaquetária (PAF), metabólitos do ácido araquidônico e proteínas derivadas dos macrófagos (Quagliarello e Scheld, 1992; Tunkel e Scheld, 1993).

Deste modo, ocorre a ativação e a liberação de citocinas e quimiocinas, desencadeando a migração de neutrófilos a partir do sangue periférico para o sítio da infecção, estes por sua vez são responsáveis por uma excessiva produção de EROS. Este processo é responsável pela peroxidação lipídica, quebras no ácido desoxirribonucleico (DNA), danos mitocondriais e nitração da tirosina, devido o aumento na produção de ERO e, ou diminuição das defesas antioxidantes, provocada pelo estresse oxidativo (Klein, Koedel e Pfister, 2006), resultando em danos cerebrais, muitas vezes irreversíveis (Brandt, 2010a).

## 1.5 INFLAMAÇÃO NEURONAL

Muitas células cerebrais tais como astrócitos, células da glia, células endoteliais, células ependimárias e macrófagos residentes, podem produzir citocinas e moléculas pró-inflamatórias em resposta a replicação bacteriana e seus componentes (Kronfol e Remick, 2000). Foi detectado em um estudo o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6 no LCR em todos os recém-nascidos com meningite (Krebs et al., 2005).

O TNF- $\alpha$  é um marcador de resposta inflamatória aguda em crianças com meningite bacteriana (Mukai et al., 2006) e é essencial para uma adequada resposta imune do hospedeiro (Aas et al., 2005). A IL-1 $\beta$  é uma citocina importante que tem efeitos estimuladores potentes sobre leucócitos do sangue e promove a aderência de neutrófilos e monócitos nas células endoteliais (Ostergaard et al., 2004).

A IL-6 tem efeitos predominantemente pró-inflamatórios, tais como febre, leucocitose, atuando na indução de proteínas de fase aguda (Gruol e Nelson, 1997), atuando também como uma citocina anti-

inflamatória, sua falta aumenta a resposta inflamatória, diminuindo a permeabilidade vascular na meningite bacteriana (Paul et al., 2003). Em estudos em modelo animal, observou-se que após a indução da meningite pneumocócica neonatal, os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , citocina quimiotática indutora de neutrófilo tipo-1 (CINC-1) e IL-6 estavam aumentados antes da quebra da BHE (Barichello et al., 2012b). O CINC-1 está envolvido na infiltração de células inflamatórias para o parênquima cerebral (Katayama et al., 2009).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é amplamente distribuído por todo o cérebro e tem demonstrado capacidade de proteger os neurônios contra os danos causados pelo estresse oxidativo, metabólico e citotóxico (Marini et al., 2007). O BDNF tem uma importante função reguladora na proliferação celular e exerce efeitos neuroprotetores via modulação da plasticidade sináptica, regulando densidade sináptica e a expressão de proteínas sinápticas (Tartaglia et al., 2001; Abdallah et al., 2013).

## 1.6 ESTRESSE OXIDATIVO

A definição para radicais livres é de moléculas com um ou mais elétrons não-pareados em orbitais atômicos ou moleculares (Halliwell e Gutteridge, 2007). As ERO podem ser definidas como moléculas derivadas da redução parcial do oxigênio molecular que reagem com moléculas orgânicas e são citotóxicas, podendo induzir a morte celular neuronal. Em baixas concentrações, essas moléculas atuam em processos celulares de defesa contra agentes patogênicos e reposta mitogênica (Valko et al., 2007).

Os mecanismos de defesa contra o excesso de radicais livres envolvem a atividade de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. No grupo de defesas antioxidantes enzimáticas encontram-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). Enquanto que no grupo de antioxidantes não-enzimáticos estão ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutatona, carotenóides, flavonóides e outros (De Menezes et al., 2009). Em condições normais, a produção de espécies reativas é balanceada pelo sistema de defesa antioxidante no organismo. Entretanto, quando a geração de espécies reativas excede a capacidade das defesas antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo (Droge, 2002).

O processo de estresse oxidativo é determinado pelo balanço entre a quantidade de espécies oxidantes geradas e a capacidade dos processos metabólicos de produzir antioxidantes (Halliwell e

Gutteridge, 2007). O SNC é especialmente vulnerável aos efeitos deletérios do estresse oxidativo, e isso ocorre devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados, que podem ser alvos das ERO, e por possuir uma baixa concentração das defesas antioxidantes (De Menezes et al., 2009).

Após a interação entre o microrganismo e o hospedeiro ocorre a resposta de defesa, que envolve tanto componentes do sistema imune humoral como o celular. As células mononucleares desempenham um papel fundamental, liberando uma variedade de interleucinas e uma série de outras moléculas, como quimiocinas, mediadores lipídicos como o fator ativador de plaquetas, prostaglandinas, leucotrienos e ERO (Brandt, 2010b). A produção maciça de ERO leva a danos colaterais que contribuem para processos neuroinflamatórios e a propagação da doença (Klein et al., 2006). Radicais livres são altamente reativos e podem causar danos em lipídios, proteínas, carboidratos ou ácidos nucléicos, aumentando assim o risco de sequelas.

## 1.7 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

A BHE é formada por células endoteliais microvasculares, astrócitos, e pericitos. Esta barreira age controlando a troca de substâncias para dentro e para fora do cérebro, protegendo o mesmo de toxinas e patógenos (Kim, 2008).

As bactérias podem atravessar a BHE por diferentes mecanismos, sendo eles, transcelular, paracelular e em fagócitos infectados. A travessia transcelular ocorre quando o microrganismo penetra as células sem qualquer evidencia de ruptura nas células ou junções intracelular (Kim, 2008). *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* e *E. coli* podem atravessar a BHE através deste mecanismo (Kim, 2003). Para atravessar a BHE o *Streptococcus pneumoniae* deve interagir com fosforilcolina da parede celular e o receptor do fator de ativação plaquetária (Kim, 2008).

A disfunção da BHE é um elemento importante da progressão de várias doenças do SNC (Weiss et al., 2009). A quebra da BHE permite que circulem substâncias neurotóxicas para o parênquima cerebral, com infiltração de leucócitos e ativação da microglia, promovendo uma resposta inflamatória (Cardoso et al., 2010).

## 1.8 AMBIENTE ENRIQUECIDO

Pacientes sobreviventes a meningite neonatal apresentam risco de deficiência neurológica em longo prazo, em um estudo prospectivo com crianças de 5 anos de idade mostrou que as que tiveram meningite neonatal foram 10 vezes mais propensas a ter deficiência moderada ou grave do que aquelas que nunca tiveram meningite (Bedford et al., 2001).

As sequelas neurológicas mais frequentes em pacientes sobreviventes de meningite são surdez, paralisia cerebral, déficits sensorio-motor, distúrbios convulsivos e neurointelectual, incluindo déficits de aprendizado e memória. (Anderson et al., 1997; De Louvois et al., 2005).

Crianças com reconhecida sequela neurológica devem ser encaminhadas para um acompanhamento neurológico, terapia ocupacional e fisioterapia, assim elas têm a oportunidade de alcançar uma maior recuperação de seu potencial (Swanson, 2015).

Uma intervenção que pode ter um potencial efeito sobre a função cognitiva é a promoção de estímulos e oportunidades educacionais. A relação entre a qualidade do ambiente e a função cognitiva pode ser avaliada através de intervenções de enriquecimento do ambiente doméstico e escolar (Bangirana et al., 2006). Estudos mostraram que crianças que receberam intervenções de enriquecimento do ambiente domiciliar e escolar demonstraram melhor funcionalidade cognitiva quando comparadas a crianças em que o ambiente não foi enriquecido (Bangirana et al., 2006).

O enriquecimento ambiental é o termo utilizado quando se expõe animais a estímulos maiores do que eles receberiam em condições de habitação normais. As estratégias de enriquecimento físico envolvem modificações estruturais das gaiolas, incluindo maior espaço e a inclusão de recursos como túneis de plástico, objetos de madeira para roer, cordas, balanços, rodas de corrida, bolas, rampas, escadas e outros brinquedos de animais de tamanho adequado que permitem aos animais mais exercícios, maior exploração e automaticamente maior função cognitiva (Rosenzweig e Bennett, 1996).

A estimulação ambiental é crítica para o desenvolvimento cerebral. Estudos prévios demonstraram que o enriquecimento do ambiente pode promover alterações estruturais e funcionais no SNC, incluindo aumento das ramificações dendríticas, expressão de proteínas sinápticas, plasticidade sináptica e neurogênese (Ickes et al., 2000; He et al., 2010).

Ickes e colaboradores (2000) demonstraram que o ambiente enriquecido melhora a memória espacial e a neuroplasticidade e induz aumento na expressão de neurotrofinas como fator de crescimento neuronal (NGF), BDNF e neurotrofina-3 (NT-3), que são os três fatores neurotróficos expressos no hipocampo, envolvidos na neuroplasticidade relacionada à memória e aprendizado (Ickes et al., 2000).

Além disso, o ambiente enriquecido (AE), quando utilizado numa tentativa de minimizar o dano cognitivo, torna-se uma promissora abordagem não farmacológica e tem sido demonstrado que estimula a plasticidade cerebral, neurogênese e aumento da expressão do fator neurotrófico, bem como protege contra os efeitos de danos cerebrais (Fares et al., 2013).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os mediadores inflamatórios, integridade da barreira hematoencefálica e parâmetros comportamentais em ratos Wistar neonatos submetidos ao ambiente enriquecido após indução da meningite por *Streptococcus pneumoniae*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e CINC-1 no hipocampo e córtex cerebral de ratos neonatos nos tempos de 6,12,24, 48 e 96 horas após a indução da meningite pneumocócica.

- Avaliar a integridade da BHE no hipocampo e córtex cerebral de ratos neonatos nos tempos de 6, 12, 18, 24 e 30 horas após a indução da meningite pneumocócica.

- Avaliar a atividade da superóxido dismutase e da catalase no hipocampo e córtex cerebral dos animais nos tempos de 6,12, 24 e 48 horas após a indução da meningite pneumocócica.

- Avaliar os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, atividade da mieloperoxidase e dano a proteína no hipocampo e córtex cerebral dos animais nos tempos de 6,12, 24 e 48 horas após a indução da meningite pneumocócica.

- Avaliar dano de memória e aprendizagem na vida adulta de animais submetidos à meningite pneumocócica no período neonatal e expostos ao ambiente enriquecimento.

- Analisar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4, IL-6, BDNF e CINC-1 no hipocampo e LCR de ratos adultos sobrevivente à meningite pneumocócica durante o período neonatal, tratados com antibiótico.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Experimental, Laboratório de Neurociências, Laboratório de Fisiopatologia e Laboratório de Bioenergética da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESC 53/2010 e 88/2012.

#### 3.2 ORGANISMO INFECTANTE

*S. pneumoniae* (sorotipo 3) foi cultivado durante a noite em 10 mL de caldo Todd Hewitt, diluído em meio fresco e cultivado até a fase logarítmica. Esta cultura foi centrifugada durante 10 min a 5.000 x g e novamente suspensa em solução salina estéril até a concentração de  $1 \times 10^6$  UFCol/mL. O tamanho do inóculo foi confirmado por cultura quantitativa (Grandgirard et al., 2007b).

#### 3.3 PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DA MENINGITE

*S. pneumoniae*, sorotipo III, proveniente do Instituto Adolfo Lutz, foi cultivado durante a noite em 10 mL de caldo Todd Hewitt, diluída em meio fresco e crescidas até a fase logarítmica. A cultura foi centrifugada durante 10 min a 5000 x g e novamente suspensa em solução salina estéril até a concentração de  $5 \times 10^9$  UFCol/mL (Grandgirard et al., 2007b).

#### 3.4 PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DA MENINGITE

Foram utilizados ratos Wistar machos neonatos de 3/4 dias vida (15 - 20 g de peso corporal), provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Todos os procedimentos cirúrgicos e inoculações bacterianas foram realizados sob anestesia, composta de uma administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina (6,6 mg/kg), cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg) (Grandgirard et al., 2007b; Hoogman et al., 2007).

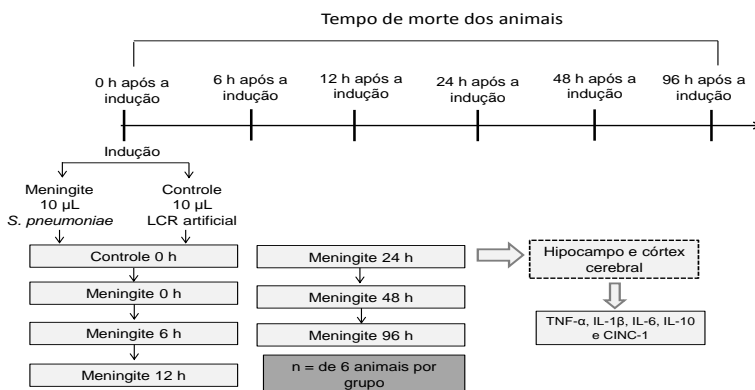
Os animais foram submetidos a uma punção na cisterna magna com uma agulha calibre 23, recebendo 10  $\mu$ L de solução salina estéril

como placebo ou volume equivalente de suspensão bacteriana de *S. pneumoniae*. No momento da inoculação, os animais receberam reposição volêmica com 1 ml de soro fisiológico sub cutâneo e foram subsequentemente devolvidos às suas gaiolas (Irazuzta et al., 2002; Irazuzta et al., 2008). Dezoito horas após a indução, a meningite foi realizado a confirmação da infecção bacteriana, por uma cultura quantitativa de 5 µL de LCR obtido por punção da cisterna magna (Grandgirard et al., 2007a; Grandgirard et al., 2007b; Grandgirard e Leib, 2010).

### 3.4 TESTES BIOQUÍMICOS

#### 3.4.1 Dosagens de citocinas, quimiocinas e CINC-1

Para avaliação das citocinas, quimiocinas e CINC-1 os animais foram divididos em 7 grupos experimentais: grupo controle (n = 6); meningite 0h (n = 6); meningite 6h (n = 6); meningite 12h (n = 6); meningite 24 h (n = 6), meningite 48 h (n = 6) e meningite 96h (n = 6), resultando em um total de 42 animais, esses mesmo foram eutanasiados por decapitação nos tempos acima descritos após a indução da meningite e em seguida as estruturas cerebrais hipocampo e córtex foram imediatamente isoladas e armazenadas a -80°C para posterior análise dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e CINC-1 (Figura 1).



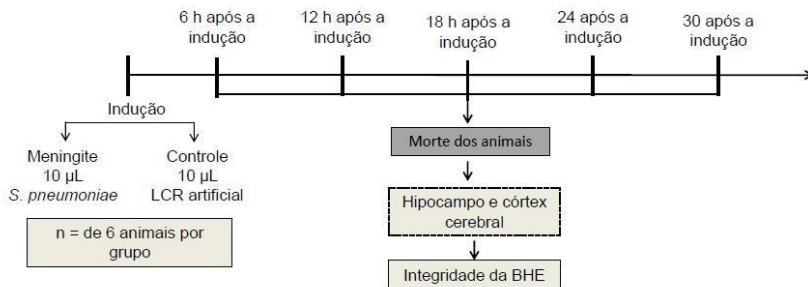
**Figura 1:** Linha de tempo representando o desenho experimental para dosagens de citocinas, quimiocinas e CINC-1. Fonte: Laboratório de Microbiologia Experimental, UNESC.

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 foram recolhidos e armazenados a -20°C. A concentração de citocinas e quimiocinas 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).

### 3.4.2 Permeabilidade da barreira hematoencefálica por azul de Evans

Para avaliação da integridade da BHE, os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: controle (n = 6) e meningite (n = 6) e eutanasiados em diferentes tempos: 6, 12, 18, 24 e 30 h após a indução da meningite. Para cada tempo houve um grupo controle e um

meningite (n = 12 por tempo), o total de animais para avaliação da integridade da BHE foi de 60 animais (Figura. 2).

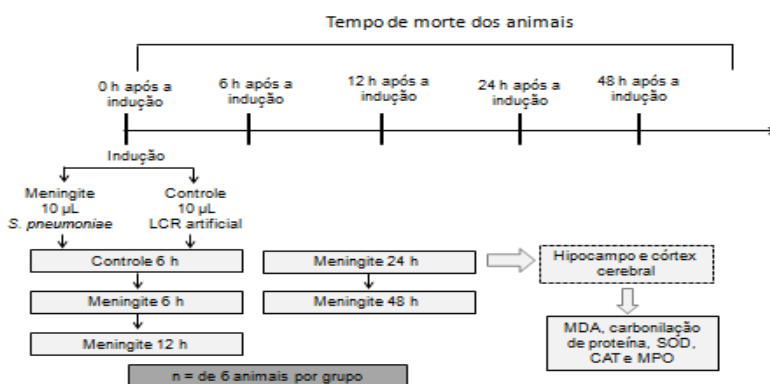


**Figura 2:** Linha de tempo representando o desenho experimental para avaliação da integridade da BHE. Fonte: Laboratório de Microbiologia Experimental, UNESC.

A integridade da BHE foi analisada através do extravasamento do corante azul de Evans (Smith e Hall, 1996). Os animais foram anestesiados, com uma dose intraperitoneal de cloridrato de cetamina 6,6 mg/kg e cloridrato de xilazina 0,3 mg/kg (Grandgirard et al., 2007b; Hoogman et al., 2007), após foi então administrado 1 mL de azul de Evans (1% dissolvido em solução salina 0,9%) por via intravenosa através da veia femoral uma hora e meia antes de serem eutanasiados (Kawai et al., 2001) a seguir o tórax foi aberto e o coração foi 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 fosse obtido a partir do átrio direito. Após os animais foram mortos por decapitação, sendo as estruturas hipocampo e córtex retiradas e armazenadas a -80 °C para o posterior teste bioquímico. 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), onde foi determinada a sua fluorescência (excitação em 620 nm e emissão a 680 nm) com um espectrofotômetro (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.

### 3.4.3 Dano oxidativo e defesa enzimática

Para avaliação do estresse oxidativo e atividade da mieloperoxidase os animais foram divididos em 5 grupos experimentais: controle (n = 6); meningite 6 h (n = 6); meningite 12 h (n = 6); meningite 24 h (n = 6) e meningite 48 h (n = 6). O total de animais para avaliação do estresse oxidativo e mieloperoxidase foi de 30 animais (Figura3).



**Figura 3:** Linha de tempo representando o desenho experimental para avaliação do estresse oxidativo e atividade da mieloperoxidase. Fonte: Laboratório de Microbiologia Experimental, UNESC.

#### 3.4.3.1 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como indicativo de peroxidação lipídica foi medido a concentração de TBARS tecidual durante uma reação ácida aquecida como previamente descrito (Draper e Hadley, 1990). Brevemente, as amostras obtidas foram misturadas com 1mL de ácido tricloroacético 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%, em seguida foram aquecidas por 15 minutos, e após a quantidade de TBARS foi determinada pela absorbância em 535 nanometro (nm) através de espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído por miligrama de proteínas (Lowry et al., 1951).

#### 3.4.3.2 Dano a proteínas

O dano a proteínas foi avaliado pela determinação dos grupos carbonil, conforme previamente descrito por (Levine et al., 1990). Brevemente, as proteínas foram precipitadas pela adição de 20% de ácido tricloroacético e redissolvido em dinitrofenilidrazina, sendo a absorvância avaliada a 370 nm.

#### *3.4.3.3 Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)*

A atividade da catalase foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorvância do peróxido de hidrogênio em 240 nm conforme previamente descrito (Aebi, 1984).

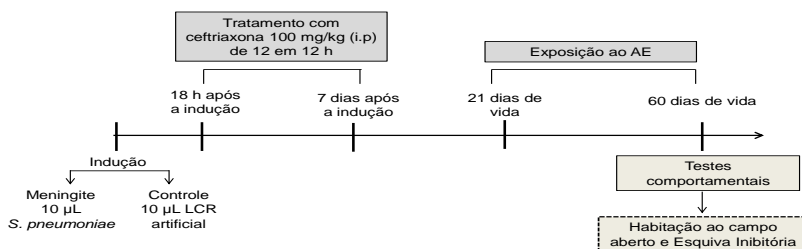
A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente conforme previamente descrito (Lissi et al., 1995).

#### *3.4.3.4. Atividade da mieloperoxidase*

Os tecidos foram homogeneizados (50 mg/mL) em 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugado a 15.000 g durante 40 min. A suspensão foi sonicada três vezes durante 30 s. Uma parte do sobrenadante foi misturado com solução de tetrametilbenzidina 1,6 mM e 1 mM de  $H^2O^2$ . A atividade foi medida espectrofotometricamente, como a variação de absorvância a 650 nm a 37 °C.(De Young et al., 1989).

### 3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

Foram realizados 2 testes comportamentais: habituação ao campo aberto e esquiva inibitória. Para os testes os animais foram divididos em dois grupos: controle (n = 10) e meningite (n = 10). Dezoito horas após a indução os animais foram tratados com ceftriaxona (100 mg/kg) 2 vezes ao dia, durante 7 dias (Figura 4).



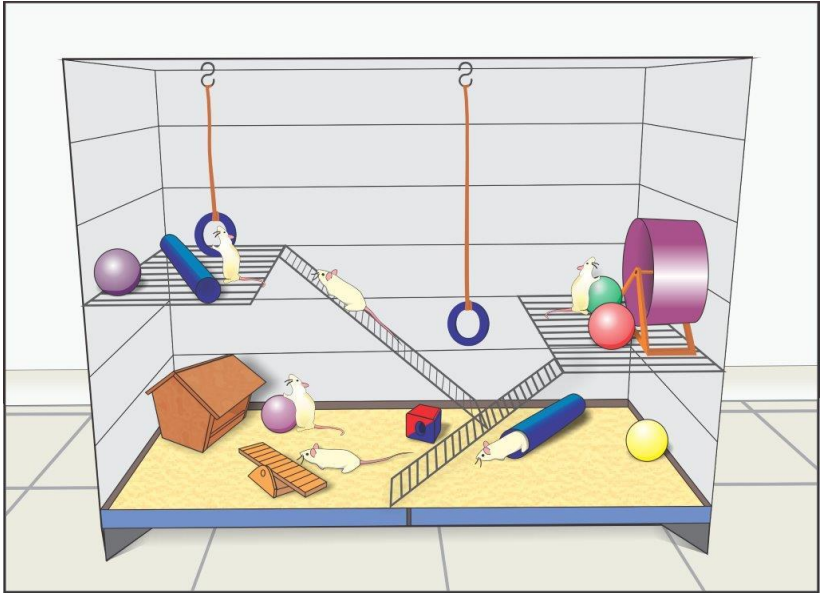
**Figura 4:** Linha de tempo representando o desenho experimental para testes comportamentais. Fonte: Laboratório de Microbiologia Experimental, UNESC.

### 3.5.1 Ambiente enriquecido

Para o enriquecimento de ambiente os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: controle ( $n = 10$ ); controle/enriquecimento de ambiente ( $n = 10$ ); meningite ( $n = 10$ ) e meningite/enriquecimento de ambiente ( $n = 10$ ).

Após 21 dias de vida os animais foram desmamados e expostos ao ambiente enriquecido durante três horas diárias, até atingirem 60 dias de vida, o que equivale à fase adulta.

O ambiente enriquecido consiste em um aparato de 40 x 60 x 90 cm. Nas caixas de ambiente enriquecido estão dispostos vários objetos como roda de corrida, escadas, rampas, tubos, cubos de Lego, peças de madeira, itens de suspensão, dentre outros objetos. A cada semana, os objetos foram substituídos por novos (Ohlsson e Johansson, 1995; Pereira et al., 2007; Avital et al., 2011). Permanecerem em cada caixa 6 animais com alimento e água disponíveis durante todos os períodos em que os animais estiveram nas caixas (Ickes et al., 2000) (Figura 5).



**Figura 5:** Ambiente enriquecido. Fonte: Laboratório de Microbiologia Experimental, UNESC.

Os animais dos grupos controle e meningite permaneceram na caixa de habitação padrão ( $49 \times 34 \times 16$  cm) sem objetos de enriquecimento ambiental, contendo apenas roupa de cama. Os animais foram mantidos em grupos de 6 com livre acesso a comida e água.

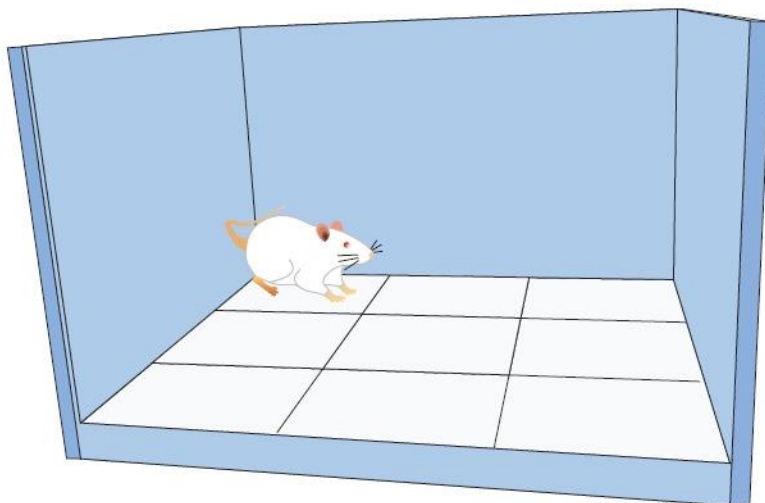
Quando atingiram 60 dias de vida os animais foram submetidos aos testes comportamentais e posterior retirada de estruturas para dosagens de citocinas, quimiocinas e BDNF.

### 3.5.2 Habituação ao campo aberto

O comportamento foi avaliado no aparato de campo aberto, a fim de avaliar as duas atividades locomotoras e exploratórias. O aparato mede  $40 \times 60$  centímetros de campo aberto cercado por 50 centímetros de parede feitas de madeira com um vidro frontal (Figura 7). O piso do campo aberto é dividido em 9 retângulos por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante traseiro esquerdo e, em seguida, deixados sozinhos para explorar a arena por cinco minutos (sessão treino). Imediatamente após este procedimento, os animais foram levados de volta para a sua gaiola moradia e 24 horas após eles



foram submetidos a uma nova sessão no aparelho de campo aberto (sessão de teste). Durante 5 minutos, em ambas as sessões, foram observadas e documentadas todas as vezes que o animal atravessava as linhas pretas demarcadas ou realizava atividade exploratória através de levantamentos. A diminuição do número de cruzamentos (crossings) e levantamentos (rearings) entre as duas sessões foi tomado como uma medida da retenção de memória de habituação (Vianna et al., 2000).

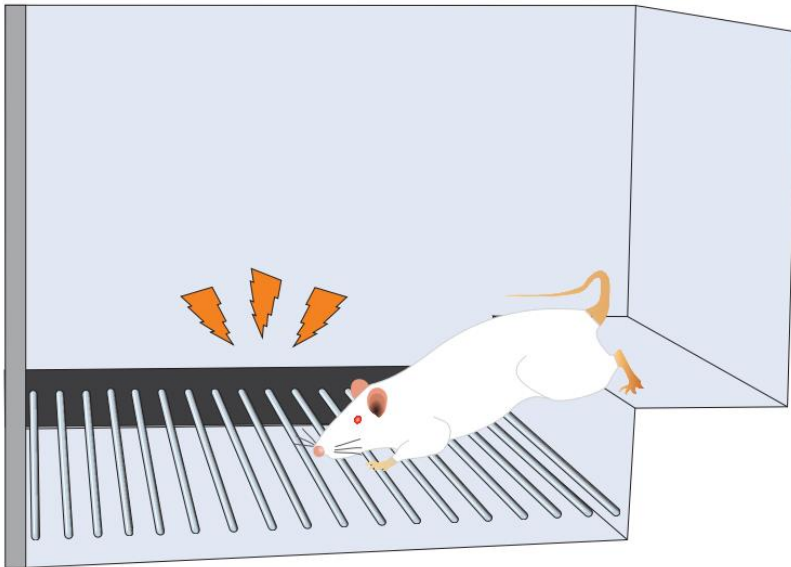


**Figura 6:** Teste de habituação ao campo aberto. Figura elaborada pelo autor.

### 3.5.3 Esquiva innibitória

Este teste comportamental avalia a memória aversiva. O aparelho e os procedimentos têm sido descritos em estudos anteriores (Quevedo et al., 1997; Roesler et al., 2003). Resumidamente, o aparato consiste em uma caixa de acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm (Albarsch, Porto Alegre, Brasil), cujo piso consiste em barras paralelas de aço inoxidável (diâmetro de 1 mm) espaçadas em uma distância de 1 cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento foi colocada junto à parede esquerda do aparelho, conforme figura 8. Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo que estes levaram para descer sobre as grades com as quatro patas foi cronometrado com um dispositivo automático. Imediatamente após

tocarem com as quatro patas na grade, os animais receberam um choque de 0,4 mA durante 2 segundos e voltaram à sua gaiola de origem. A sessão teste foi realizada 24 h após o treinamento (memória de longo prazo). Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele levou para descer (latência), porém não foi administrado o choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003).



**Figura 7:** Teste de esquiwa inibitória. Fonte Laboratório de Neurociências, UNESC.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

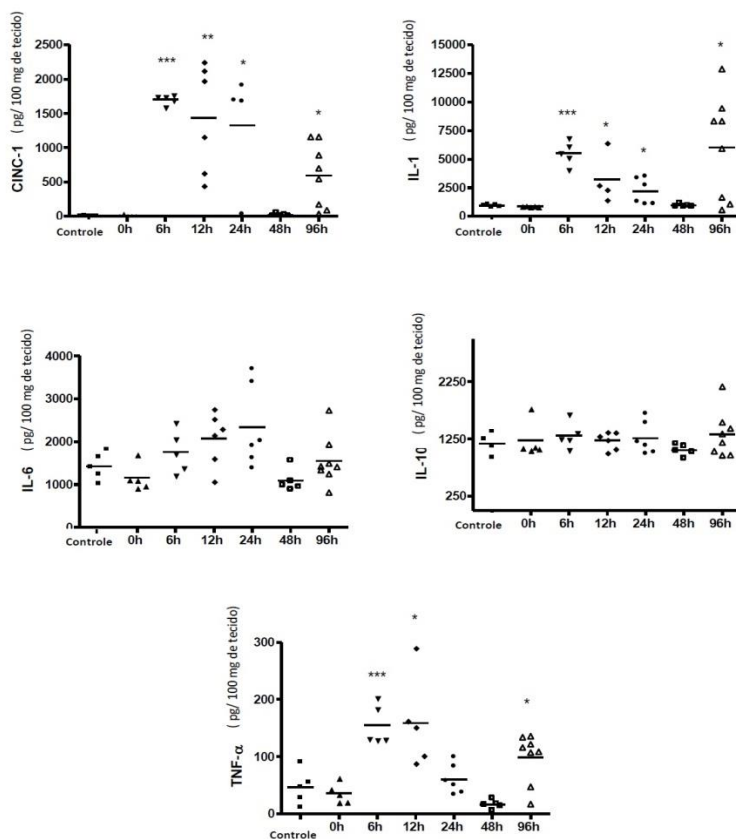
O dados de citocinas, quimiocina e BDNF foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. As diferenças de cada grupo foram avaliadas através da análise da variância (ANOVA), seguido do *post-hoc* de Tukey. Para o teste de habituação ao campo aberto foram apresentados como média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo, e analisados por teste t de Student pareado e ANOVA seguido do teste *post-hoc* de Tukey. Dados da tarefa de esquiwa inibitória foram apresentados como mediana e intervalo interquartil, 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. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. O programa StatisticalPackage for Social Sciences (SPSS) 20.0 foi utilizado para análises estatísticas.

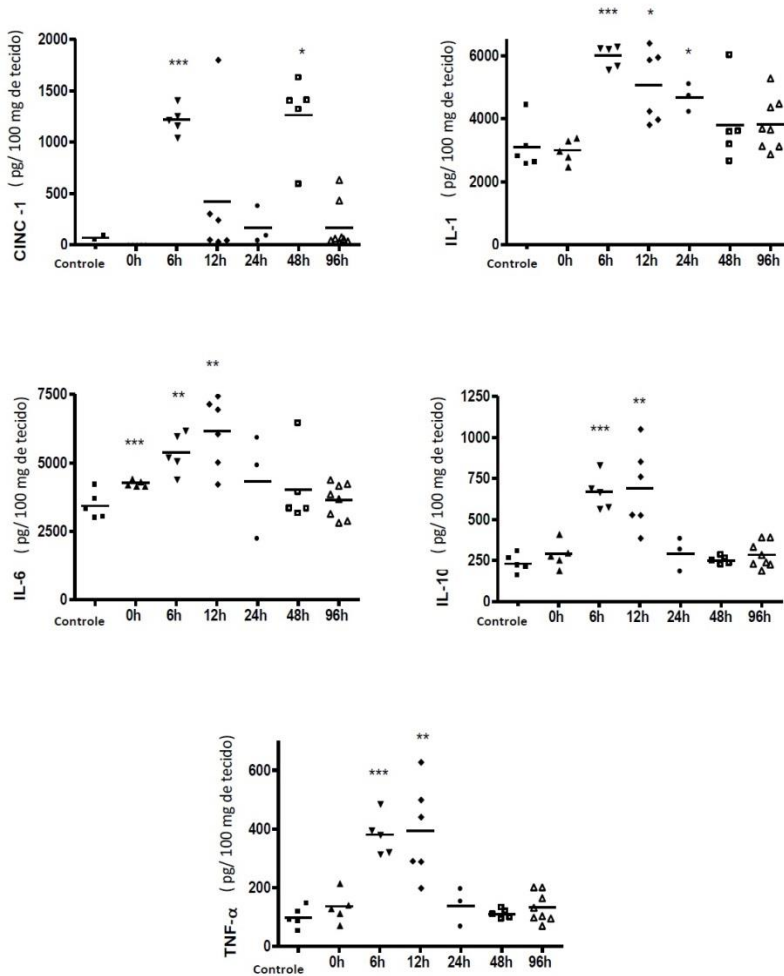
#### 4 RESULTADOS

No hipocampo (Figura 8) houve um aumento nos níveis de CINC-1 e IL-1 $\alpha$  em 6 h ( $p<0.01$ ;  $p<0.05$ , respectivamente), 12 h ( $p<0,05$ ), 24 h ( $p<0,001$ ) e 96 h ( $p<0, 001$ ) após a indução da meningite pneumocócica. As citocinas IL-6 e IL-10 não foram alteradas quando comparados com o grupo controle e os níveis de TNF- $\alpha$  aumentaram em 6 h ( $p<0,01$ ), 12 h ( $p<0,001$ ) e 96 h ( $p<0,05$ ).

No córtex (figura 9) os níveis de CINC-1 aumentaram em 6 h ( $p<0,05$ ) e 48 h ( $p>0,001$ ). A IL-1 $\alpha$  aumentou em 6 h ( $p<0,001$ ), 12 h e 24 h ( $p<0,05$ ). A IL-6 aumentou em 0 h ( $p<0.001$ ), 6 h e 12h ( $p<0.01$ ). Os níveis de IL-10 e TNF- $\alpha$  aumentaram apenas em 6 h ( $p<0,001$ ) e 12 h ( $p<0,01$ ) após a indução da meningite pneumocócica.



**Figura 8:** Avaliação dos níveis de CINC-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e expressão de TNF- $\alpha$  no hipocampo após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Os resultados mostram a média  $\pm$  EPM de 4-6 animais em cada grupo. Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

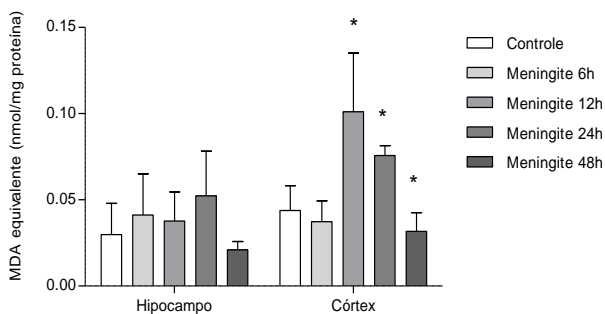


**Figura 9:** Avaliação dos níveis de CINC-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e expressão de TNF- $\alpha$  no córtex cerebral após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Os resultados mostram a média  $\pm$  EPM de 4-6 animais em cada grupo. Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

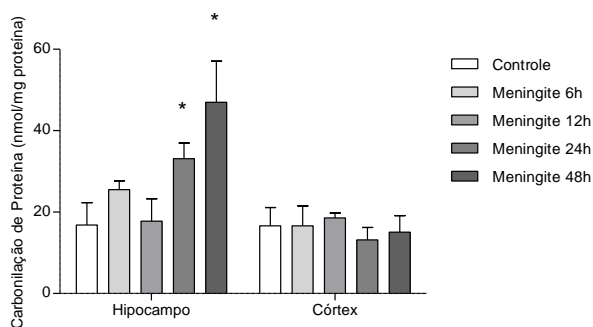
Na Figura 10, demonstramos o dano oxidativo no hipocampo e córtex dos animais. Os níveis de TBARS aumentaram em 12 h e 24 h no

córtex ( $p < 0,05$ ) e em 48h houve uma diminuição desta concentração. No hipocampo, os níveis não sofreram alteração (Figura 10A). A carbonilação de proteínas foi aumentada em 24 h e 48 h no hipocampo ( $p < 0,05$ ) (Figura 10B).

**A**



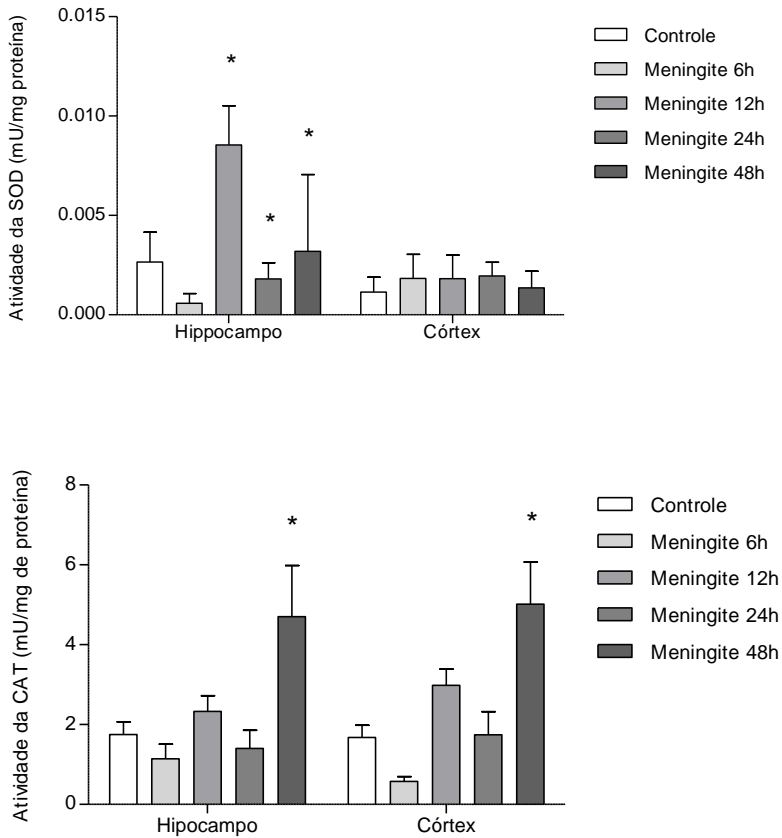
**B**



**Figura 10:** Dano oxidativo no cérebro de rato durante o desenvolvimento de meningite pneumocócica em 6, 12, 24 e 48 horas após a indução. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 5$  para cada grupo). \* Diferença significativa em comparação com o grupo controle \*  $p < 0,05$ .

Na figura 11, mostramos a defesa enzimática no hipocampo e córtex dos animais. Houve um aumento na atividade da SOD (Figura

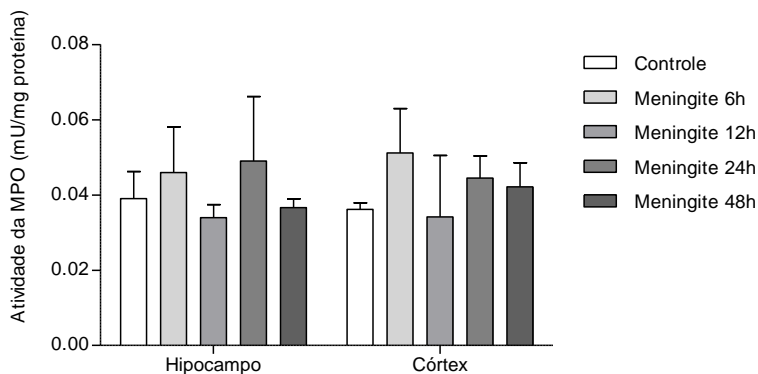
11A) no hipocampo em 12 e 48h ( $p<0,05$ ) e uma diminuição dos níveis de SOD em 24h ( $p<0,05$ ). A atividade da CAT (Figura 11B) aumentou em 48h no hipocampo e no córtex após a indução meningite( $p<0,05$ ).



**Figura 11:** Atividade enzimática cérebro de rato durante o desenvolvimento de meningite pneumocócica em 6, 12, 24 e 48 horas após a indução. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 5$  para cada grupo). \* Diferença significativa em comparação com o grupo controle \*  $p<0,05$ .

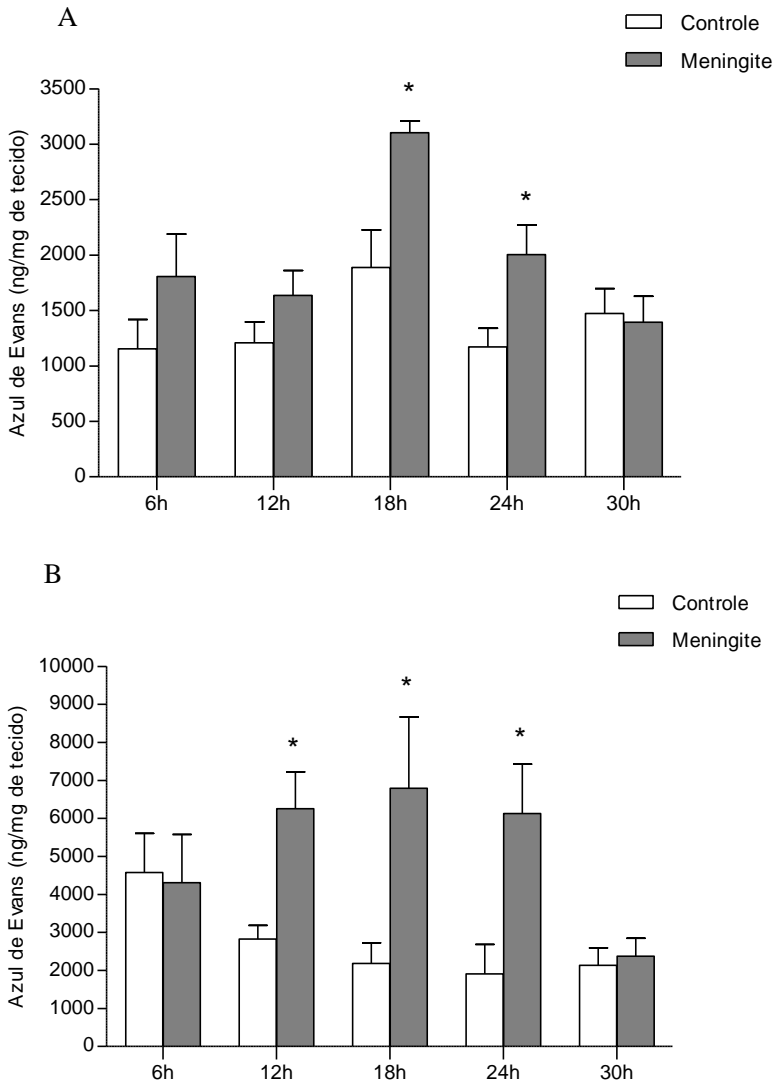
Os níveis da atividade da MPO não se alteraram no hipocampo e no córtex após a indução (Figura 12).





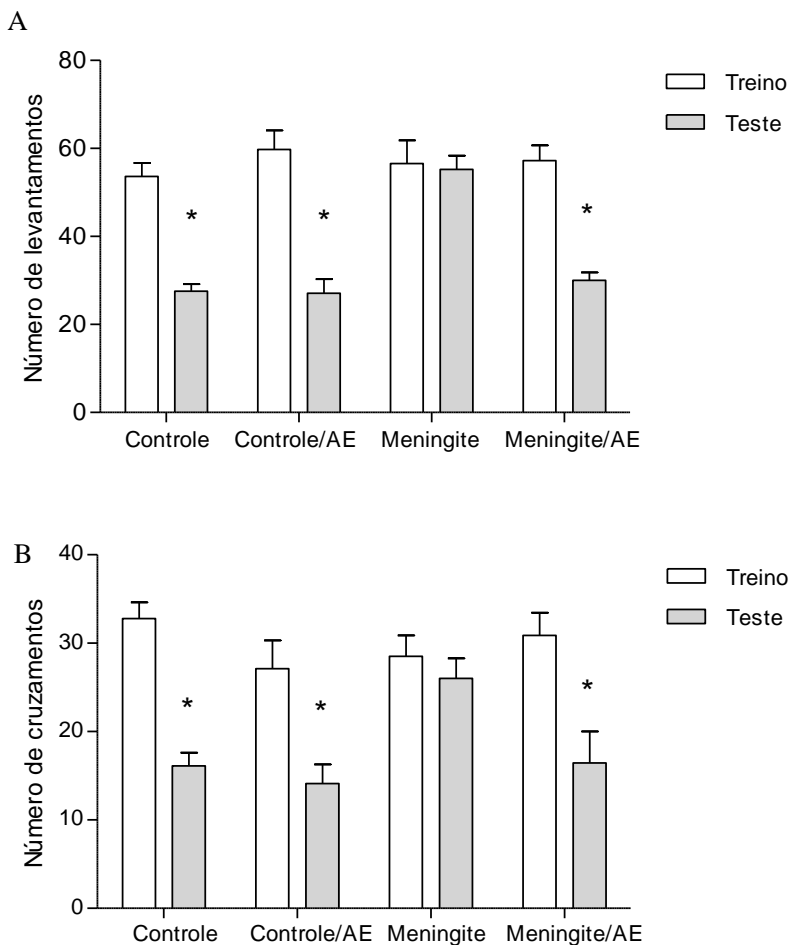
**Figura 12:** Atividade Mieloperoxiase no hipocampo e córtex dos animais em 6, 12, 24 e 48 horas após a indução da meningite pneumocócica. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n = 5-6 para cada grupo). \* Diferença significativa em comparação com o grupo controle \*  $p < 0,05$ .

A verificação da integridade da BHE no hipocampo (Figura 13A) e córtex (Figura 13B) foi investigada através do extravasamento do corante azul de Evans. Observou-se que houve uma quebra da BHE no hipocampo, no prazo de 18 h e 24h ( $p < 0,05$ ) e no córtex que teve início em 12h até 24h após a indução da meningite pneumocócica ( $p < 0,05$ ).



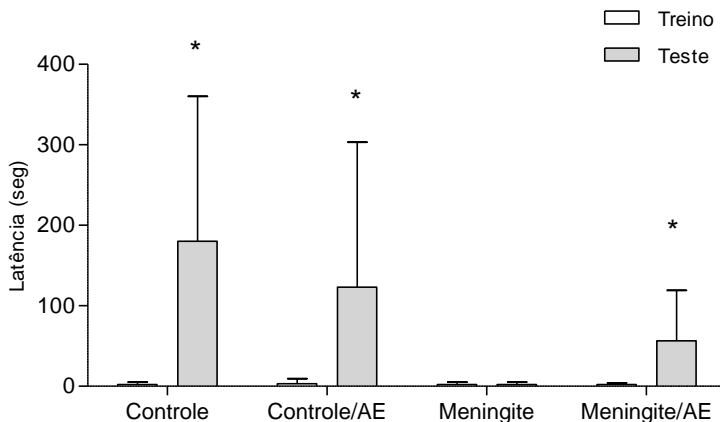
**Figura 13:** Integridade da BHE investigada utilizando o extravasamento do corante azul de Evans no hipocampo e no córtex após a indução de meningite por *S. pneumoniae*. (A) hipocampo e (B) córtex foram obtidos no em 6, 12, 18, 24 e 30 h após a indução da meningite. Os resultados mostram a média e desvio padrão (5-7 animais por grupo). Os símbolos indicam estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle  $p < 0.05$ .

Na figura 14, mostramos os resultados do teste de habituação ao campo aberto, onde houve diferença no número de levantamentos (Figura 14A) e cruzamentos (Figura 14B) nos grupos controle, controle/AE e meningite/AE nas sessões treino e teste ( $p > 0,05$ ).



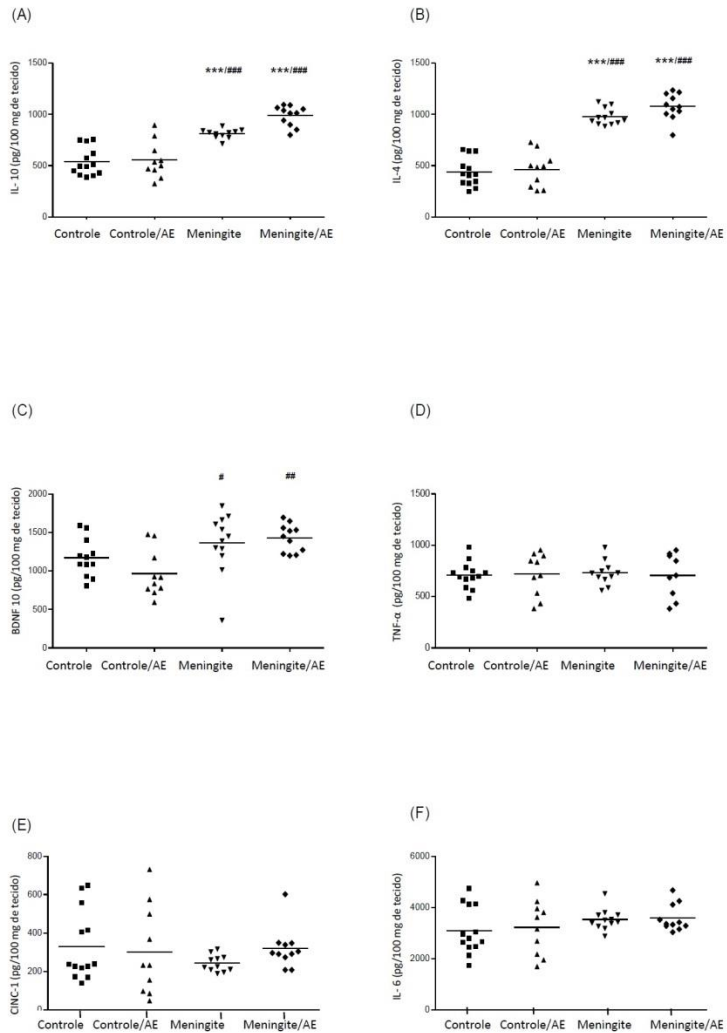
**Figura 14:** Habituação à tarefa de campo aberto em ratos Wistar adultos com 60 dias após a indução da meningite pneumocócica durante a infância. Os resultados dos números de levantamentos e cruzamentos mostram a média e desvio padrão (10 animais por grupo). Os símbolos indicam estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle  $p < 0,05$ .

Na atividade de esquiwa inibitória (Figura 15), verificou-se que houve diferenças significativas quando os animais dos grupos controle, controle/AE e meningite/AE foram reexpostos ao aparelho de esquiwa inibitória na sessão teste em comparação a latência da sessão treino, exibindo memória aversiva adquirida para essa tarefa, no entanto, quando avaliamos a memória do grupo meningite, observamos que este não apresentou memória aversiva, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).



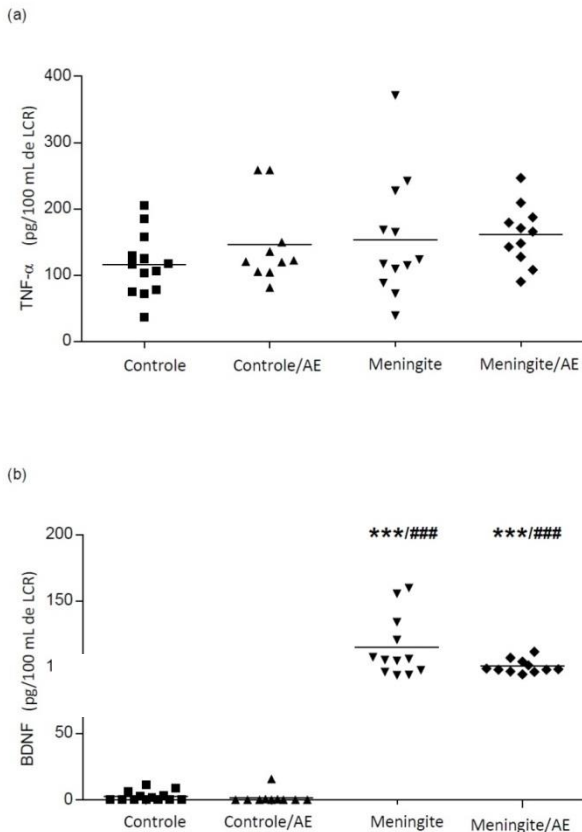
**Figura 15:** Tarefa de esquiwa inibitória em ratos Wistar adultos com 60 dias após a indução da meningite pneumocócica durante a infância. O resultado da latência mostra a média e desvio padrão (10 animais por grupo). Os símbolos indicam estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle  $p < 0,05$ .

Na figura 16, mostramos a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-4, CINC-1 e BDNF no hipocampo dos animais na vida adulta, após sobreviverem à meningite pneumocócica na infância. Observamos que os níveis de IL-10 e IL-4 (A e B) dos grupos meningite e meningite/AE apresentaram um aumento significativo quando comparado aos grupos controle ( $p < 0,001$ ) e controle/AE ( $p < 0,001$ ). Foi observado que os níveis de BDNF (C) do grupo meningite ( $p < 0,05$ ) e meningite/AE ( $p < 0,01$ ) apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo controle/AE.



**Figura 16:** Avaliação dos níveis de CINC-1, BDNF, IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  no hipocampo dos animais sobreviventes a meningite na infância. Os resultados mostram a média  $\pm$  EPM de 10-13 animais por grupo. A significância estatística foi avaliada por ANOVA, seguida do teste post-hoc de Tukey. Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo de controle (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , e \*\*\*  $p < 0,001$ ) e (#  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , e ###  $p < 0,001$ ) em comparação ao grupo controle/AC.

A figura 17 mostra os níveis de TNF- $\alpha$  (Figura 17A) e BDNF (Figura 17B) no LCR dos animais na vida adulta, após sobreviverem à meningite pneumocócica na infância. Observamos que os níveis de BDNF nos grupos meningite e meningite/AE apresentaram um aumento significativo quando comparados aos grupos controle ( $p < 0,001$ ) e controle/AE ( $p < 0,001$ ).



**Figura 17:** Avaliação da concentração de BDNF e TNF- $\alpha$  no líquido cefalorraquidiano dos animais sobreviventes a meningite na infância. Os resultados mostram a média  $\pm$  EPM de 10-13 animais por grupo. A significância estatística foi avaliada por ANOVA, seguida do teste *post-hoc* de Tukey. Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo de controle (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , e \*\*\* $p < 0,001$ ) e (# $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$ ) em comparação ao grupo controle/AE.

## 5 DISCUSSÃO

Este trabalho mostrou a influência do *S. pneumoniae* sobre níveis os de citocinas/quimiocinas, MPO, estresse oxidativo e integridade da BHE em duas regiões do cérebro, o hipocampo e o córtex de ratos recém-nascidos induzidos a meningite pneumocócica.

O cérebro dos neonatos produziu níveis mais altos de citocinas/quimiocinas, dano oxidativo e de defesa enzimática no início da infecção. Depois disso, observou-se a quebra da BHE no hipocampo e no córtex dos recém-nascidos infectados.

Em outros estudos, as concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL - 10, bem como a infiltração de granulócitos apresentaram um aumento em 18h pós-infecção no LCR (Sury et al., 2011), e apoptose ocorreu em neurônios imaturos pós-mitóticos do giro dentado em meningite experimental pneumocócica neonatal (Grandgirard et al., 2007b; Grandgirard et al., 2007c). Além disso, ratos recém-nascidos submetidos à meningite pneumocócica apresentaram déficit de comportamento na idade adulta (Barichello et al., 2010a).

A meningite bacteriana é uma doença devastadora durante o período neonatal (Huang et al., 2000), causando uma inflamação grave e complexa que está associada com uma elevada taxa de mortalidade (Hoffman e Maldonado, 2008). Os componentes celulares bacterianos são reconhecidos por receptores Toll-like de ativação da resposta imune do hospedeiro (Klein et al., 2006). Em consequência, ele conduz à ativação do fator NF- $\kappa$ B e desencadeia a expressão de citocinas inflamatórias e consequente aumento de leucócitos polimorfonucleares, os quais são atraídos para a corrente sanguínea e atravessam a BHE (Granert et al., 1994). Como resultado, grandes quantidades de  $O_2^-$  e NO são produzidos, o que leva à formação de ONOO $^-$  (Klein et al., 2006) iniciando a peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e estresse oxidativo (Zhang et al., 2002; Sellner et al., 2010). Foi encontrada carbonilação de proteína apenas no hipocampo as 24 e 48 horas e no córtex foi verificado peroxidação lipídica nas primeiras horas após indução. Além disso, os lipídios da membrana neuronal contêm uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados, principalmente nas regiões corticais (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O estresse oxidativo também leva a ativação de citocina/quimiocina, metaloproteinase de matriz e aumento da ativação

de neutrófilos (Klein et al., 2006). Em nosso estudo, verificamos um aumento de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CINC-1 no hipocampo em 6h, e manteve-se elevada até 96 horas após a indução da meningite. O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , tem um papel importante como citocinas de resposta inflamatória inicial (Nathan e Scheld, 2000). Em pacientes, assim como em modelo animal de meningite, o TNF- $\alpha$  aumentou precocemente no curso da doença (Brivet et al., 2005; Barichello et al., 2010b), e também a administração de TNF- $\alpha$  no LCR resultou na quebra da BHE e geração de uma inflamação neutrofílica (Rosenberg et al., 1995; Tureen, 1995). A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória que media algumas alterações relacionadas com meningite bacteriana, tais como, febre, neutrofilia (Saukkonen et al., 1990) e é produzida por células fagocíticas mononucleares e por células gliais do SNC através da estimulação por substâncias bacterianas ou TNF- $\alpha$  (Nathan e Scheld, 2000). Outra quimiocina envolvida na migração de células inflamatórias, infiltradas no parênquima cerebral é a CINC-1 (Katayama et al., 2009). No estudo, verificamos que os níveis CINC-1 começaram a aumentar nas primeiras horas no hipocampo e no córtex após a indução bacteriana. Em estudos anteriores, verificou-se o aumento dos níveis de CINC-1 em 6h após a indução da meningite (Barichello et al., 2010b).

Estes níveis aumentaram primeiro no plasma da jugular e, em seguida, no plasma arterial em modelo animal de meningite pneumocócica, sugerindo sua produção no cérebro (Barichello et al., 2012c; Barichello et al., 2012d). CINC-1 é um quimio-atraente de neutrófilos e pode estar relacionada com eventos precoces na fisiopatologia da meningite pneumocócica. As citocinas e CINC-1 aumentam antes da quebra BHE e essa alteração da permeabilidade da BHE ocorreu no hipocampo em 18 horas e no córtex em 12 h após a indução da meningite pneumocócica. Os microrganismos podem induzir disfunção BHE por afetar a liberação e/ou expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão celular, o que resulta no aumento da permeabilidade BHE e pleocitose (Kim, 2003).

Os nossos resultados demonstram que, durante este período, houve um aumento de peroxidação lipídica, carbonilização de proteína, citocinas e quimiocinas demonstrando que infecções bacterianas neonatais são graves. A interferência com a complexa rede de citocinas, quimiocinas, oxidantes e outros mediadores inflamatórios, pode ser responsável pela quebra da BHE e tendem a agravar a doença (Klein et al., 2010).



Sequelas neurológicas de longo prazo são encontrados em pacientes que sobrevivem a meningite bacteriana durante a infância, incluindo a surdez, déficits sensorio-motor, convulsões e deficiências cognitivas como déficits de aprendizagem e memória (Meli et al., 2002).

O AE utilizado em uma tentativa de minimizar o dano cognitivo é uma abordagem não farmacológica promissora e tem sido demonstrado que estimula a plasticidade cerebral, neurogênese e aumento da expressão do fator neurotrófico, bem como protege contra os efeitos de danos cerebrais (Fares et al., 2013).

Este estudo mostrou que o enriquecimento ambiental preveniu a cognição em ratos que tiveram meningite pneumocócica neonatal. AE não altera o perfil de BDNF ou de citocinas em ratos adultos que tiveram meningite durante a infância. Os resultados atuais são consistentes com estudos anteriores do nosso grupo que mostram que os ratos que sobreviveram a meningite pneumocócica neonatal ou meningite por *S. agalactiae* apresentaram comprometimento de aprendizagem e de memória na vida adulta (Barichello et al., 2010a; Barichello et al., 2013).

Comparado como grupo controle, o AE fornece maior oportunidades para o exercício voluntário e exploração de objetos novos, o que facilita a maior estimulação sensorial e cognitiva bem como a atividade física. Em vários modelos animais de distúrbios neurológicos, AE e exercício têm demonstrado efeitos vantajosos, incluindo efeitos benéficos sobre a aprendizagem e memória, melhora da plasticidade celular, expressão BDNF e neurogênese adulta (Ickes et al., 2000; Van Praag et al., 2000; Fares et al., 2013; Pang e Hannan, 2013).

Neste estudo os animais submetidos a meningite pneumocócica durante a infância apresentaram prejuízo de memória na idade adulta. Nos animais que foram submetidos à AE (promovendo a estimulação cognitiva através da atividade motora, estímulos visuais, reconhecimento de objetos, novidades, e modulação da atenção), estas deficiências de habituação e memórias aversivas foram prevenidas. AE também foi associado com melhor desempenho aprendizagem, neuroplasticidade, e os níveis aumentados de BDNF no cérebro dos ratos (Ickes et al., 2000).

Este tratamento adjuvante não invasivo foi efetivo na indução da recuperação da memória prejudicada para reconhecimento de objetos e na preservação de densidade na espinha dendrítica hipocampal em ratos neonatais no acompanhamento de hipóxia isquemia (Rojas et al., 2013).

O AE tem demonstrado conferir benefícios cognitivos em longo prazo após dano traumático cerebral em ratos, incluindo aumento na

expressão de genes importantes para transdução de sinal, as vias de sinalização de cálcio, homeostase de membrana e no metabolismo(Cheng et al., 2012; Shin et al., 2013).

O AE atenuou a produção de citocinas e quimiocinas em resposta a lipopolissacarídeos dentro do hipocampo e diminui a neuroinflamação do hipocampo durante infecção porInfluenza em roedores adultos(Jurgens e Johnson, 2012; Williamson et al., 2012).

No presente estudo, os níveis de mediadores inflamatórios não diferiu significativamente entre o grupo de meningite e meningite/grupo AE; Assim, a prevenção de dano cognitivo não foi associada a esses parâmetros. O BDNF é uma importante neurotrofina que desempenha um papel importante no desenvolvimento, diferenciação e sobrevivência neuronal. A exposição ao AE restaura a expressão normal de BDNF após a redução dos mesmos por hipoperfusão cerebral crônica em ratos(Sun et al., 2010).

O AE também aumentou a expressão do BDNF durante infecção por influenza e aumentou dos níveis de BDNF no prosencéfalo basal, córtex cerebral e hipocampo em ratos adultos(Ickes et al., 2000; Jurgens e Johnson, 2012).

Na idade adulta, os níveis BDNF foram aumentados no LCR e no hipocampo em ambos grupos meningite. Este aumento nos níveis de BDNF em ambos os grupos de meningite pode estar relacionado com a manutenção dos níveis de citocinas durante a idade adulta, considerando que as células imunes podem expressar BDNF e que os neurônios são a principal fonte desta neurotrofina no SNC(Kerschensteiner et al., 1999).

Correlacionando com os achados clínicos, em pacientes pediátricos com meningoencefalite e meningite bacteriana, tem-se encontrado elevados níveis de BDNF no LCR e no plasma(Chiaretti et al., 2004).

A avaliação do desenvolvimento neuropsicomotor em crianças deve considerar a idade da criança na aquisição de marcos de desenvolvimento, como sorrisosocial, desenvolver adequado do controle da cabeça, estender a mão para objetos, rolar, ser capaz de manter uma posição sentada, chegar a uma posição sentada sem apoio, rastejar, caminhar de forma independente, balbuciar, e uso de primeiras palavras, frases e sentenças (Shevell e Association, 2009).

As crianças que apresentam ou que podem ter uma anormalidade neurológica ou neuromuscular devem ser submetidos a uma avaliação neurológica completa, incluindo: história clínica, exame neurológico detalhado e itens adicionais do exame físico geral que são relevantes

para neurologia infantil. Em alguns casos, os testes de rastreio do desenvolvimento, também são úteis (Swaiman et al., 2006).

Como o processo de desenvolvimento é evolutivo, uma avaliação normal em um determinado momento, não assegura que continuará normal, devendo ser acompanhado até idade escolar.

Transpondo este trabalho para prática clínica, os resultados obtidos sugerem que programas de estimulação precoce para os sobreviventes de meningite neonatal podem ser benéficos na prevenção ou recuperação de danos cognitivos e de memória. Semelhante ao ambiente enriquecido utilizado neste trabalho, sala multissensorial (Snoezeling) proporciona uma grande quantidade de estímulos motores e sensoriais, visuais, sonoros, táteis e até odores, proporcionando uma grande interação e estimulação de potencialidades (Lotan, 2006).

## 6. CONCLUSÃO

Após indução de meningite em ratos Wistar neonatos por *S. Pneumoniae* obtivemos aumento de citocinas antes da quebra da BHE e essa ruptura ocorreu no hipocampo em 18h e no córtex em 12h após a indução da meningite pneumocócica. A associação entre tempo de infecção e as complexas interações entre citocinas, quimiocina podem ser responsável pela quebra BHE e severidade da meningite pneumocócica neonatal.

O AE pode ser uma estratégia experimental não invasiva para a recuperação neurológica após meningite bacteriana na infância. Maiores conhecimentos são necessários para elucidar os mecanismos subjacentes aos efeitos do enriquecimento ambiental na prevenção de disfunção neuronal.

## REFERÊNCIAS

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-32.
- Abdallah MW, Mortensen EL, Greaves-Lord K, Larsen N, Bonefeld-Jorgensen EC, Norgaard-Pedersen B, Hougaard DM, Grove J. Neonatal levels of neurotrophic factors and risk of autism spectrum disorders. *Acta Psychiatr Scand.* 2013;128(1):61-9.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- Anderson V, Bond L, Catroppa C, Grimwood K, Keir E, Nolan T. Childhood bacterial meningitis: impact of age at illness and acute medical complications on long term outcome. *J Int Neuropsychol Soc.* 1997;3(2):147-58.
- Avital A, Dolev T, Aga-Mizrachi S, Zubedat S. Environmental enrichment preceding early adulthood methylphenidate treatment leads to long term increase of corticosterone and testosterone in the rat. *PLoS One.* 2011;6(7):15.
- Bangirana P, Idro R, John CC, Boivin MJ. Rehabilitation for cognitive impairments after cerebral malaria in African children: strategies and limitations. *Trop Med Int Health.* 2006;11(9):1341-9.
- Barichello T, Belarmino E, Jr., Comim CM, Cipriano AL, Generoso JS, Savi GD, Stertz L, Kapczinski F, Quevedo J. Correlation between behavioral deficits and decreased brain-derived neurotrophic [correction of neurotrophic] factor in neonatal meningitis. *J Neuroimmunol.* 2010a; 23(1-2):73-6.
- Barichello T, Ceretta RA, Generoso JS, Moreira AP, Simoes LR, Comim CM, Quevedo J, Vilela MC, Zuairi AW, Crippa JA, Teixeira AL. Cannabidiol reduces host immune response and prevents cognitive impairments in Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis. *Eur J Pharmacol.* 2012a;697(1-3):158-64.

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*. 2010b;221(1-2):42-5.

Barichello T, Fagundes GD, Generoso JS, Paula Moreira A, Costa CS, Zanatta JR, Simoes LR, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Carvalho Vilela M, Lucio Teixeira A. Brain-blood barrier breakdown and pro-inflammatory mediators in neonate rats submitted meningitis by *Streptococcus pneumoniae*. *Brain Res*. 2012b;1471:162-8.

Barichello T, Generoso JS, Collodel A, Moreira AP, Almeida SM. Pathophysiology of acute meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* and adjunctive therapy approaches. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012c;70(5):366-72.

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*. 2012d;31(8):2005-9.

Barichello T, Lemos JC, Generoso JS, Carradore MM, Moreira AP, Collodel A, Zanatta JR, Valvassori SS, Quevedo J. Evaluation of the brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor and memory in adult rats survivors of the neonatal meningitis by *Streptococcus agalactiae*. *Brain Res Bull*. 2013;92:56-9.

Barichello T, Santos AL, Savi GD, Generoso JS, Otaran P, Michelon CM, Steckert AV, Mina F, Comim CM, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Antioxidant treatment prevents cognitive impairment and oxidative damage in pneumococcal meningitis survivor rats. *Metab Brain Dis*. 2012e;27(4):587-93.

Barichello T, Santos AL, Silvestre C, Generoso JS, Cipriano AL, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Comim CM, Quevedo J. Dexamethasone treatment reverses cognitive impairment but increases brain oxidative stress in rats submitted to pneumococcal meningitis. *Oxid Med Cell Longev*. 2011;2011:173035.

Bedford H, de Louvois J, Halket S, Peckham C, Hurley R, Harvey D. Meningitis in infancy in England and Wales: follow up at age 5 years. *BMJ*. 2001;323(7312):533-6.

Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci*. 2003;17(4):897-902.

Brandt CT. Experimental studies of pneumococcal meningitis. *Dan Med Bull*. 2010a;57(1).

Brandt CT. Experimental studies of pneumococcal meningitis. *Dan Med Bull*. 2010b;57(1):B4119.

Brivet FG, Jacobs FM, Megarbane B. Cerebral output of cytokines in patients with pneumococcal meningitis. *Crit Care Med*. 2005;33(11):2721-2; author reply 2-3.

Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev*. 2010;64(2):328-63.

Cheng JP, Shaw KE, Monaco CM, Hoffman AN, Sozda CN, Olsen AS, Kline AE. A relatively brief exposure to environmental enrichment after experimental traumatic brain injury confers long-term cognitive benefits. *J Neurotrauma*. 2012;29(17):2684-8.

Chiaretti A, Antonelli A, Piastra M, Genovese O, Polidori G, Aloe L. Expression of neurotrophic factors in cerebrospinal fluid and plasma of children with viral and bacterial meningoencephalitis. *Acta Paediatr*. 2004;93(9):1178-84.

Cohen-Wolkowicz M, Moran C, Benjamin DK, Cotten CM, Clark RH, Benjamin DK, Jr., Smith PB. Early and late onset sepsis in late preterm infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(12):1052-6.

Dawson KG, Emerson JC, Burns JL. Fifteen years of experience with bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 1999;18(9):816-22.

de Louvois J, Halket S, Harvey D. Neonatal meningitis in England and Wales: sequelae at 5 years of age. *Eur J Pediatr.* 2005;164(12):730-4.

de Menezes CC, Dorneles AG, Sperotto RL, Duarte MM, Schetinger MR, Loro VL. Oxidative stress in cerebrospinal fluid of patients with aseptic and bacterial meningitis. *Neurochem Res.* 2009;34(7):1255-60.

De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions.* 1989;26(3-4):335-41.

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

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.

Estripeaut DS-L, X. Perinatal bacterial diseases. In: Saunders E, editor. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases.* 6 ed. Philadelphia 2009. p.979.

Fares RP, Belmeguenai A, Sanchez PE, Kouchi HY, Bodennec J, Morales A, Georges B, Bonnet C, Bouvard S, Sloviser RS, Bezin L. Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats. *PLoS One.* 2013;8(1):e53888.

Furyk JS, Swann O, Molyneux E. Systematic review: neonatal meningitis in the developing world. *Trop Med Int Health.* 2011;16(6):672-9.

Garges HP, Moody MA, Cotten CM, Smith PB, Tiffany KF, Lenfestey R, Li JS, Fowler VG, Jr., Benjamin DK, Jr. Neonatal meningitis: what is the correlation among cerebrospinal fluid cultures, blood cultures, and cerebrospinal fluid parameters? *Pediatrics.* 2006;117(4):1094-100.

Gaschignard J, Levy C, Romain O, Cohen R, Bingen E, Aujard Y, Boileau P. Neonatal Bacterial Meningitis: 444 Cases in 7 Years. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(3):212-7.



Grandgirard D, Bifrare YD, Pleasure SJ, Kummer J, Leib SL, Tauber MG. Pneumococcal meningitis induces apoptosis in recently postmitotic immature neurons in the dentate gyrus of neonatal rats. *Dev Neurosci*. 2007a;29(1-2):134-42.

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*. 2007b;51(6):2173-8.

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

Granert C, Raud J, Xie X, Lindquist L, Lindbom L. Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit. *J Clin Invest*. 1994;93(3):929-36.

Greenberg RG, Benjamin DK, Jr., Cohen-Wolkowicz M, Clark RH, Cotten CM, Laughon M, Smith PB. Repeat lumbar punctures in infants with meningitis in the neonatal intensive care unit. *J Perinatol*. 2011;31(6):425-9.

Gurol DL, Nelson TE. Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol Neurobiol*. 1997;15(3):307-39.

Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*: OUP Oxford; 2007.

He S, Ma J, Liu N, Yu X. Early enriched environment promotes neonatal GABAergic neurotransmission and accelerates synapse maturation. *J Neurosci*. 2010;30(23):7910-6.

Hoffman RW, Maldonado ME. Immune pathogenesis of Mixed Connective Tissue Disease: a short analytical review. *Clin Immunol*. 2008;128(1):8-17.

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.

Huang SH, Stins MF, Kim KS. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes Infect*. 2000;2(10):1237-44.

Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol*. 2000;164(1):45-52.

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.

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ: *Nature*. 1998 Jun 18;393(6686):635-6.

Jordan HT, Farley MM, Craig A, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Lynfield R, Thomas A, Zansky S, Gershman K, Albanese BA, Schaffner W, Schrag SJ. Revisiting the need for vaccine prevention of late-onset neonatal group B streptococcal disease: a multistate, population-based analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(12):1057-64.

Jurgens HA, Johnson RW. Environmental enrichment attenuates hippocampal neuroinflammation and improves cognitive function during influenza infection. *Brain Behav Immun*. 2012;26(6):1006-16.

Katayama T, Tanaka H, Yoshida T, Uehara T, Minami M. Neuronal Injury Induces Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-1 (CINC-1) Production in Astrocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2009; 109(1): 88-93.

Kawai N, Kawanishi M, Okauchi M, Nagao S. Effects of hypothermia on thrombin-induced brain edema formation. *Brain Res.* 2001;895(1-9):50-8.

Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med.* 1999;189(5):865-70.

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

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

Kim KS. Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(1):32-42.

Klein M, Koedel U, Kastenbauer S, Pfister HW, van de Beek D, Schut ES, Brouwer MC, Steiner I. Delayed cerebral thrombosis after initial good recovery from pneumococcal meningitis: past as prologue: delayed stroke as a parainfectious process of bacterial meningitis? *Neurology.* 2010;75(2):193; author reply -4.

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

Klinger G, Chin CN, Beyene J, Perlman M. Predicting the outcome of neonatal bacterial meningitis. *Pediatrics.* 2000;106(3):477-82.

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

Krebs VL, Okay TS, Okay Y, Vaz FA. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of newborn with meningitis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005;63(1):7-13.

Kronfol Z, Remick DG. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*. 2000;157(5):683-94.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464-78.

Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med*. 1995;18(2):153-8.

Lotan M. Management of Rett syndrome in the controlled multisensory (Snoezelen) environment. A review with three case stories. *Scientific World Journal*. 2006;6:791-807.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 93(1):265-75.

Marini AM, Jiang X, Wu X, Pan H, Guo Z, Mattson MP, Blondeau N, Novelli A, Lipsky RH. Preconditioning and neurotrophins: a model for brain adaptation to seizures, ischemia and other stressful stimuli. *Amino Acids*. 2007;32(3):299-304.

May M, Daley AJ, Donath S, Isaacs D. Early onset neonatal meningitis in Australia and New Zealand, 1992-2002. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2005;90(4):F324-7.

Meli DN, Christen S, Leib SL, Tauber MG. Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Opin Infect Dis*. 2002;15(3):253-7.

Molyneux EM, Walsh AL, Forsyth H, Tembo M, Mwenechanya J, Kayira K, Bwanaisa L, Njobvu A, Rogerson S, Malenga G. Dexamethasone treatment in childhood bacterial meningitis in Malawi: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9328):211-8.

Mukai AO, Krebs VL, Bertoli CJ, Okay TS. TNF-alpha and IL-6 in the diagnosis of bacterial and aseptic meningitis in children. *Pediatr Neurol*. 2006;34(1):25-9.

Nathan BR, Scheld WM. New Advances in the Pathogenesis and Pathophysiology of Bacterial Meningitis. *Curr Infect Dis Rep.* 2000;2(4):332-6.

Nizet VK, J.O. Bacterial sepsis and meningitis. In: Saunders E, editor. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.* 7 ed. Philadelphia 2011. p.222.

O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS, Cherian T. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet.* 2009;374(9693):893-902.

Ohlsson AL, Johansson BB. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats. *Stroke.* 1995;26(4):644-9.

Okike IO, Johnson AP, Henderson KL, Blackburn RM, Muller-Pebody B, Ladhani SN, Anthony M, Ninis N, Heath PT. Incidence, etiology, and outcome of bacterial meningitis in infants aged <90 days in the United kingdom and Republic of Ireland: prospective, enhanced, national population-based surveillance. *Clin Infect Dis.* 2014a;59(10):e150-7.

Okike IO, Ribeiro S, Ramsay ME, Heath PT, Sharland M, Ladhani SN. Trends in bacterial, mycobacterial, and fungal meningitis in England and Wales 2004-11: an observational study. *Lancet Infect Dis.* 2014b;14(4):301-7.

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.

Overall JC, Jr. Neonatal bacterial meningitis. Analysis of predisposing factors and outcome compared with matched control subjects. *J Pediatr.* 1970; 76(4): 499-511.

Pang TY, Hannan AJ. Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. *Neuropharmacology.* 2013;64:515-28.

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.

Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, da Rocha AP, Achaval M, Netto CA. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem*. 2007;87(1):101-8.

Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K, Stefonek KR, Albanese BA, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA*. 2008;299(17):2056-65.

Polin RA, Harris MC. Neonatal bacterial meningitis. *Semin Neonatol*. 2001;6(2):157-72.

Quagliarello V, Scheld WM. Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med*. 1992;327(12):864-72.

Quevedo J, Vianna M, Zanatta MS, Roesler R, Izquierdo I, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA. Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory. *Behav Pharmacol*. 1997;8(8):713-7.

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.

Rojas JJ, Deniz BF, Miguel PM, Diaz R, Hermel Edo E, Achaval M, Netto CA, Pereira LO. Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Exp Neurol*. 2013;241:25-33.

Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE, Stetler-Stevenson WG. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced gelatinase B causes delayed opening of

the blood-brain barrier: an expanded therapeutic window. *Brain Res.* 1995;703(1-2):151-5.

Rosenzweig MR, Bennett EL. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res.* 1996;78(1):57-65.

Saez-Llorens XM, G.H. Jr. Krugman's Infectious Diseases of Children. In: Mosby, editor. *Krugman's Infectious Diseases of Children*. 11 ed. Philadelphia 2004.

Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wolpe S, Sherry B, Cerami A, Tuomanen E. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J Exp Med.* 1990;171(2):439-48.

Sellner J, Tauber MG, Leib SL. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections. *Handb Clin Neurol.* 2010;96:1-16.

Shevell M, Association ICN. *Neurodevelopmental Disabilities: Clinical and Scientific Foundations*: Wiley; 2009.

Shin SS, Bales JW, Yan HQ, Kline AE, Wagner AK, Lyons-Weiler J, Dixon CE. The effect of environmental enrichment on substantia nigra gene expression after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2013;30(4):259-70.

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.

Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK. To tap or not to tap: high likelihood of meningitis without sepsis among very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2004;113(5):1181-6.

Sun H, Zhang J, Zhang L, Liu H, Zhu H, Yang Y. Environmental enrichment influences BDNF and NR1 levels in the hippocampus and restores cognitive impairment in chronic cerebral hypoperfused rats. *Curr Neurovasc Res*. 2010;7(4):268-80.

Sury MD, Vorlet-Fawer L, Agarinis C, Yousefi S, Grandgirard D, Leib SL, Christen S. Restoration of Akt activity by the bisperoxovanadium compound bpV(pic) attenuates hippocampal apoptosis in experimental neonatal pneumococcal meningitis. *Neurobiol Dis*. 2011;41(1):201-8.

SVS. Situação da Meningite Pneumocócica (MP) no Brasil em 2011. In: Saúde SdVeSdMd, editor. 2012.

Swaiman KF, Ashwal S, Ferriero DM. *Pediatric Neurology: Principles & Practice*: Mosby Elsevier; 2006.

Swanson D. Meningitis. *Pediatr Rev*. 2015;36(12):514-26.

Tartaglia N, Du J, Tyler WJ, Neale E, Pozzo-Miller L, Lu B. Protein synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*. 2001;276(40):37585-93.

Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6(2):118-36.

Tureen J. Effect of recombinant human tumor necrosis factor-alpha on cerebral oxygen uptake, cerebrospinal fluid lactate, and cerebral blood flow in the rabbit: role of nitric oxide. *J Clin Invest*. 1995;95(3):1086-91.

Tyler KL. Bacterial meningitis: an urgent need for further progress to reduce mortality and morbidity. *Neurology*. 2008;70(22 Pt 2):2095-6.

Unhanand M, Mustafa MM, McCracken GH, Jr., Nelson JD. Gram-negative enteric bacillary meningitis: a twenty-one-year experience. *J Pediatr*. 1993;122(1):15-21.

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



van de Beek D. Corticosteroids for acute adult bacterial meningitis. *Med Mal Infect.* 2009;39(7-8):531-8.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci.* 2000;1(3):191-8.

Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep.* 2010;59(RR-10):1-36.

Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 2000;7(5):333-40.

Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788(4):842-57.

Wenger JD, Hightower AW, Facklam RR, Gaventa S, Broome CV. Bacterial meningitis in the United States, 1986: report of a multistate surveillance study. The Bacterial Meningitis Study Group. *J Infect Dis.* 1990;162(6):1316-23.

Williamson LL, Chao A, Bilbo SD. Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. *Brain Behav Immun.* 2012;26(3):500-10.

Wiswell TE, Baumgart S, Gannon CM, Spitzer AR. No lumbar puncture in the evaluation for early neonatal sepsis: will meningitis be missed? *Pediatrics.* 1995;95(6):803-6.

Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem.* 2002;277(48):46116-22.

**ANEXO**



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA



**Resolução**

O Comitê de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 04/2008/Câmara Propex - Lei Federal 1153/95 (Lei Arouca), analisou o projeto abaixo.

**Protocolo: 53/2010**

**Professor:**

Tatiana Barichello

**Título: Avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e CINC-1 e integridade da barreira hemato-encefálica no cérebro de ratos neonatos e jovens submetidos à meningite pneumocócica.**

Este projeto apresenta pendências em seus aspectos éticos e/ou metodológicos, de acordo com a Lei Federal 1153/95 – Lei Arouca. A versão revisada desse projeto, cumprindo as sugestões deste Comitê, deve ser encaminhada ao CEUA no prazo de 60 (sessenta) dias pelo pesquisador responsável (orientador). O projeto deve ser encaminhado em uma via impressa acompanhado de uma carta de apresentação assinada pelo responsável.

**Ao reencaminhar o projeto, favor grifar ou colocar em negrito todas as alterações sugeridas pelo CEUA.** Caso não haja envio de nova versão no prazo estipulado, o projeto será considerado retirado. Os membros do CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar o CEUA.  
[www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua).

Criciúma, 26 de outubro de 2010.

*Carina Rodrigues Boeck*

Coordenadora do CEUA



COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Eutanásia dos animais (se aplicável):

adequado

inadequado

Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

A eutanásia será feita por decapitação.

9. Recomendação:

- ( ) Aprovado
- ( x ) Aprovado com pendências
- ( ) Não aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:

O projeto está bem elaborado e bem fundamentado e a pesquisadora responsável apresenta experiência na área do estudo e nas técnicas propostas. Deve-se acrescentar o orçamento e fonte financiadora.

  
 Wilson Heizen Cardoso  
 Coordenador Adjunto do  
 CEUA/UNESC



### Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecida pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

### Protocolo:88/2012

**Professor Responsável:** Tatiana Barichello

**Equipe:** Tatiana Barichello, Alunos de iniciação científica: Ana Paula Moreira, Jessiele Ramos Zanatta, Caroline Silva da Costa, Cintia Silvestre, Mirelle Micheletto Carradore, Samuel Galvão, Alunos de mestrado: Ana Paula Panatto, Jaqueline da Silva Generoso, Lútiliana Roque Simões e Alunos de doutorado: Glauco D. Fagundes; Renan Ceretta; Joelson C. Lemos.

**Título:** "AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E COMPORTAMENTAL EM RATOS ADULTOS INDUZIDOS A MENINGITE NO PERÍODO NEONATAL POR STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE E SUBMETIDOS AO AMBIENTE ENRIQUECIDO."

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização 200 ratos Wistar machos, com 11 dias de vida. Este projeto é válido de Julho de 2012 até março de 2013. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

### Protocol number: 88/2012

**Principal Investigator:** Tatiana Barichello

**Researchers:** Tatiana Barichello, Alunos de iniciação científica: Ana Paula Moreira, Jessiele Ramos Zanatta, Caroline Silva da Costa, Cintia Silvestre, Mirelle Micheletto Carradore, Samuel Galvão, Alunos de mestrado: Ana Paula Panatto, Jaqueline da Silva Generoso, Lútiliana Roque Simões e Alunos de doutorado: Glauco D. Fagundes; Renan Ceretta; Joelson C. Lemos.

**Project title:** "EVALUATION BIOCHEMICAL AND BEHAVIORAL IN ADULT RATS INDUCED TO NEONATAL PERIOD MENINGITIS BY STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AND SUBMITTED TO THE ENRICHED ENVIRONMENT."

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](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 28 de agosto de 2012.

*Patricia Fernanda Schuck*  
**Patricia Fernanda Schuck**

Coordenadora da CEUA