

RENORBIO  
Programa de Pós-Graduação Renorbio

Estudo do papel da proteína multifuncional APE1/Ref-1 sobre a resposta  
inflamatória na meningite bacteriana

Leonam Gomes Coutinho

**Natal - RN**  
**2013**

LEONAM GOMES COUTINHO

Estudo do papel da proteína multifuncional APE1/Ref-1 sobre a resposta inflamatória  
na meningite bacteriana

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação RENORBIO, como  
parte dos requisitos para a obtenção  
do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração:  
Biotecnologia Aplicada a Saúde

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucymara  
Fassarela Agnez-Lima

v. 1

**NATAL**  
**2013**

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de  
Biociências

Coutinho, Leonam Gomes.

Estudo do papel da proteína multifuncional APE1/ref-1 sobre a resposta inflamatória na meningite bacteriana) / Leonam Gomes Coutinho. – Natal, RN, 2013.

165 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Lucymara Fassarela Agnez-Lima.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação Renorbio.

1. Meningite bacteriana – Tese. 2. Vitamina B6 – Tese. 3. Citocinas – Tese. I. Agnez-Lima, Lucymara fassarela. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 616.831.9-002

Leonam Gomes Coutinho

Estudo do papel da proteína de reparo de DNA, APE1/ref-1,  
sobre a resposta inflamatória na meningite bacteriana

**TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA (RENORBIO) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA.**

Examinada por:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucymara Fassarela Agnez-Lima.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selma Maria Bezerra Jerônimo

---

Prof. Dr. Carlos Renato Machado

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tirzah Braz Petta Lajus

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edda Lisboa Leite

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas conquistas de cada dia;

Aos meus pais e irmã por sempre acreditarem em mim, amando, incentivando, financiando e cuidando em todos os detalhes durante toda minha vida;

A minha esposa Bruna que amo tanto e aos seus pais pelos quais tenho enorme carinho e que estão sempre cultivando e zelando carinhosamente por mim;

A toda a minha família, avó, tias, tios, primos, cunhado e sobrinho que sempre confiaram em mim;

A todos meus mestres que durante toda a minha vida acadêmica se prontificaram a transmitir os valores e experiências por eles adquiridos;

Em especial a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Lucymara F. Agnez-Lima, pela paciência e orientação;

A todos do LBMG pela amizade, pela descontração, pela harmonia e por tornar o ambiente de trabalho agradável;

A todos do IFRN que contribuíram apoiando e acreditando em mim;

E a todos os outros amigos do convívio pessoal que de alguma forma contribuíram para a realização deste objetivo.

Em especial ao CNPq e a UBS optimus foundation pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A meningite bacteriana (MB) é uma doença infecciosa que permanece com altas taxas de mortalidade e morbidade em todo o mundo, principalmente em países subdesenvolvidos, apesar dos avanços na antibioticoterapia. Um dos principais mecanismos associados às sequelas durante a MB é a elevada resposta inflamatória, que promove uma exacerbada quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) levando às células a apoptose ou necrose. A ativação de enzimas de reparo de DNA durante o estresse oxidativo tem sido demonstrada nas mais diversas desordens. Uma importante enzima envolvida neste processo é a endonuclease apurínica/apirimidinica/fator redox-1 (APE1/Ref-1). Ela é uma proteína multifuncional envolvida no reparo de DNA e na redução de fatores envolvidos com a resposta inflamatória, tais como o fator nuclear kappa B (NFκB) e proteína ativadora 1 (AP-1). Este estudo teve como objetivo identificar o envolvimento de APE1/Ref-1 na resposta inflamatória visando a possibilidade de sua utilização como alvo terapêutico na redução de sequelas durante a MB. Para isto, inicialmente foi realizado uma análise no perfil de expressão de citocinas em líquido de pacientes com meningite causada por *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseriae meningitidis* visando selecionar moduladores inflamatórios de interesse para ensaios em cultura de célula subsequentes. Em seguida, utilizando um modelo celular de indução com LPS foi avaliado o efeito da inibição da atividade de reparo e redox de APE1 sobre a expressão de citocinas inflamatórias. Por fim, foi observada a expressão de APE1 no córtex (CX) e hipocampo (HC) de ratos com MB frente a uma terapia adjuvante com vitamina B6. Nossos resultados mostraram um perfil de moduladores inflamatórios muito semelhante no líquido dos pacientes com MB causada pelos patógenos estudados, embora interferon gama (IFN $\gamma$ ) tenha sido

significativamente mais expresso em pacientes com *S. pneumoniae* do que *N. meningitidis*. Quanto ao uso dos inibidores das funções, redox e de reparo, de APE1/Ref-1 no modelo *in vitro*, houve redução significativa na expressão de algumas citocinas, principalmente o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). Além disso, os inibidores demonstraram uma redução nos níveis de ERO nas células estimuladas com LPS. No modelo animal, a expressão protéica de APE1/Ref-1, no CX e HC dos ratos, foi modulada após introdução da vitamina B6. Portanto, esses dados fornecem um novo olhar para a fisiopatologia da MB, em que citocinas como IFN $\gamma$  podem ser usadas em um diagnóstico diferencial entre meningites causadas por *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*. A proteína de reparo de DNA, APE1/Ref-1, parece ser um alvo potencial na modulação da resposta inflamatória e do estresse oxidativo, bem como a terapia adjuvante com vitamina B6 mostra ter um papel sobre a expressão de APE1/Ref-1. Consequentemente, o conhecimento obtido neste estudo pode ser importante na melhoria do prognóstico da MB, além de contribuir para entender a associação entre o reparo de DNA e inflamação.

**Palavras chave:** meningite bacteriana, APE1, citocinas, vitamina B6

**ABSTRACT**

Despite advances in antibiotic therapy, bacterial meningitis (BM) remains with high mortality and morbidity rates worldwide. One important mechanism associated to sequels during disease is the intense inflammatory response which promotes an oxidative burst and release of reactive oxygen species, consequently leading to cell death. Activation of DNA repair enzymes during oxidative stress has been demonstrated in several neurological disorders. APE1/Ref-1 is a multifunctional protein involved in DNA repair and plays a redox function on transcription factors such as NF $\kappa$ B and AP-1. The aim of this study was to assess the role of APE1/Ref-1 on inflammatory response and the possibility of its modulation to reduce the sequels of the disease. Firstly, it was performed an assay to measure cytokine in cerebrospinal fluid of patients with BM due to *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseriae meningitidis*. Further, a cellular model of inflammation was used to observe the effect of the inhibition of the endonuclease and redox activity of APE1/Ref-1 on cytokine levels. Additionally, APE1/Ref-1 expression in cortex and hippocampus of rat with MB after vitamin B6 treatment was evaluated. Altogether, results showed a similar profile of cytokines in the cerebrospinal fluid of patients from both pathogens, although IFN $\gamma$  showed higher expression in patients with BM caused by *S. pneumoniae*. On the other hand, inhibitors of APE1/Ref-1 reduced cytokine levels, mainly TNF- $\alpha$ . Reduction of oxidative stress markers was also observed after introduction of inhibitors in the LPS-stimulated cell. In the animal model, BM increased the expression of the protein APE1/Ref-1, while vitamin B6 promoted reduction. Thereby, this data rise important factors to be considered in pathogenesis of BM, e.g., IFN $\gamma$  can be used as prognostic factor during corticosteroid therapy, APE1/Ref-1 can be an important target to modulate the level of inflammation and

oxidative stress, and vitamin B6 seems modulates several proteins related to cell death. So, this study highlights a new understanding on the role of APE1/Ref-1 on the inflammation and the oxidative stress during inflammation condition.

**Key words:** bacterial meningitis, APE1, cytokines, vitamin B6

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Principais patógenos causadores da meningite bacteriana.....  | 20 |
| <b>Figura 2.</b> Alinhamento proteico de APE1 em diferentes organismos.....  | 28 |
| <b>Figura 3.</b> Principais proteínas envolvidas na via curta e longa do BER.....  | 32 |
| <b>Figura 4.</b> Fatores de transcrição reduzidos pela função redox de APE1/Ref-1.....   | 34 |
| <b>Figura 5.</b> Estrutura da proteína APE1/Ref-1 .....  | 36 |
| <b>Figura 6.</b> Estrutura tridimensional (3D) da metoxiamina e estrutura química mostrando os átomos envolvidos.....  | 40 |
| <b>Figura 7.</b> Estrutura química do (E)-3-(5,6-dimetoxi-3-metil-1,4-dioxociclohexa-2,5-dienil)-2- ácido nonilpropenóico (E3330).....   | 41 |
| <b>Figura 8.</b> Comparação dos níveis de cito/quimiocinas no LCR de pacientes com <i>S. pneumoniae</i> e <i>N. meningitidis</i> .....   | 62 |
| <b>Figura 9.</b> Análise da viabilidade, ciclo celular e fragmentação nuclear das células U937 após indução de resposta inflamatória por LPS e tratamentos com inibidores de APE1/Ref-1..... | 64 |
| <b>Figura 10.</b> Expressão de citocinas e quimiocinas por células U937 após indução de resposta inflamatória por LPS e tratamentos com inibidores de APE1/Ref-1.....                        | 66 |
| <b>Figura 11.</b> Análise da capacidade de clivagem de DNA plasmidial por APE1/Ref-1 após tratamento com resveratrol.....  | 67 |
| <b>Figura 12.</b> Perfil de expressão de APE1/Ref-1 por células U937 após indução por LPS e tratamentos com inibidores de APE1/Ref-1.....  | 69 |
| <b>Figura 13.</b> Imunofluorescência para APE1/Ref-1 e subunidade p65 de NFkB.....   | 72 |
| <b>Figura 14.</b> Verificação dos níveis de ERO e do dano 8-oxo-G.....   | 73 |
| <b>Figura 15.</b> Análise da expressão de TRX após estímulo com LPS e adição de inibidores.....  | 74 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 16.</b> Expressão relativa dos genes APE1/Ref-1 e AIF no HC e CX de ratos com MP.....               | 76 |
| <b>Figura 17.</b> Níveis protéicos de APE1/Ref-1 e AIF no HC e CX de ratos com MP....                         | 78 |
| <b>Figura 18.</b> Concentração de glutamato no HC e CX de ratos com MP.....                                   | 79 |
| <b>Figura 19.</b> Conteúdo de proteínas carboniladas no CX dos ratos com 20 e 24 h p.i.....                   | 79 |
| <b>Figura 20.</b> Modelo proposto da intervenção da vitamina B6 sobre o glutamato, ERO, APE1/Ref-1 e AIF..... | 94 |

#### LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Parâmetros biológicos dos grupos etiológicos conforme diagnóstico do LCR..... | 60 |
|--|----|

**LISTA DE ABREVIATURA**

AIF – fator indutor de apoptose

AP - apurinícos/apirimidínicos

BER - reparo por excisão de bases

CX – córtex

DCFH-DA - diclorofluoroceína-diacetato

E3330 – (E) - 3 - (5, 6 - dimetoxi - 3 - metil - 1, 4 - dioxociclohexa - 2, 5 - dienil) - 2 -  
ácido nonilpropenóico

ERO – espécies reativas de oxigênio

FACS – fluorescence-activated cell sorting

GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

G-CSF – fator estimulante de colônia de granulócito

GM-CSF - fator estimulante de colônia de granulócito e macrófago

HC – hipocampo

HiB - *Haemophilus influenzae* tipo b

IFN – interferon

IL - interleucina

IL-1Ra – interleucina antagonista do receptor 1

KP – rota da quinurenina

LCR – líquido cefalorraquidiano

LP-BER – via longa reparo por excisão de bases

LPS – lipopolissacarídeo

MB – meningite bacteriana

MCP – proteína quimiotática de monócito

MIP – proteína inflamatória de macrófago

MM – meningite meningocócica

MP – meningite pneumocócica

MX – metoxiamina

NF $\kappa$ B - fator nuclear kappa B

NLS - sinal de localização nuclear

OGG1 - DNA glicosilase de 8-oxoG

PARP1 – polimerase de poli-ADP ribose 1

PFA - paraformaldeído

PL- punção Lombar

PLP - piridoxal-5-fosfato

PMN - polimorfonuclear

RESV – resveratrol

SNC – sistema nervoso central

SNPs - polimorfismos de um único nucleotídeo

SP-BER – via curta do reparo por excisão de bases

TNF – fator de necrose tumoral

TRX – tioredoxina

## SUMÁRIO

|  |            |
|--|------------|
| <b>Resumo.....</b>   | <b>V</b>   |
| <b>Abstract.....</b>   | <b>VII</b> |
| <b>Lista de Figuras.....</b>   | <b>IX</b>  |
| <b>Lista de Tabelas.....</b>   | <b>X</b>   |
| <b>Lista de Abreviaturas.....</b>  | <b>XI</b>  |
| <br>   |            |
| <b>1.0 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>15</b>  |
| <b>2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>  | <b>18</b>  |
| <b>2.1 Meningite Bacteriana.....</b>   | <b>18</b>  |
| 2.1.1    Meningite causada por <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b e <i>Neisseriae meningitidis</i> ..... | 19         |
| 2.1.2    Meningite causada por <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....                                       | 21         |
| <b>2.2 Fisiopatologia da MB.....</b>   | <b>22</b>  |
| 2.2.1    Moduladores da resposta imune na MB.....  | 24         |
| <b>2.3 APE1/Ref-1: um alvo terapêutico na redução da resposta inflamatória durante MB.....</b>             | <b>27</b>  |
| 2.3.1    APE1/Ref-1: atividade de reparo de DNA.....   | 30         |
| 2.3.2    APE1/Ref-1: atividade redox.....  | 33         |
| 2.3.3    Efeito de polimorfismos de APE1/Ref-1 sobre a resposta inflamatória durante MB.....               | 37         |
| 2.3.4    Inibidores de APE1/Ref-1.....   | 39         |
| 2.3.4.1    Metoxiamina.....  | 39         |
| 2.3.4.2    E3000 e Resveratrol.....  | 40         |
| <b>2.4 Vitamina B6: terapia adjuvante na redução de danos cerebrais.....</b>                               | <b>43</b>  |
| <br>   |            |
| <b>3.0 OBJETIVOS.....</b>  | <b>46</b>  |
| 3.1 Geral.....   | 46         |
| 3.2 Específicos.....   | 46         |
| <br>   |            |
| <b>4.0 MATERIAIS E MÉTODOS</b>   |            |
| 4.1 Determinação do perfil de citocinas e quimiocinas em pacientes humanos.....                            | 48         |
| 4.2 Indução de inflamação em cultura de células.....   | 50         |
| 4.3 Modelo animal de meningite pneumocócica.....   | 51         |
| 4.4 Extração de RNA e PCR em tempo real.....   | 52         |
| 4.5 Extração de proteínas totais e Western blot.....   | 54         |
| 4.6 Imunofluorescência.....  | 55         |
| 4.7 Ensaio de viabilidade celular.....   | 56         |

|  |    |
|--|----|
| 4.8 Avaliação do ciclo celular por FACS .....        | 56 |
| 4.9 Avaliação de apoptose com Hoescht 33258.....     | 57 |
| 4.10 Ensaio para quantificação de ERO e 8-oxoG ..... | 57 |
| 4.11 Ensaio de clivagem de sítios AP.....            | 58 |
| 4.12 Determinação do Glutamato .....                 | 58 |
| 4.13 Conteúdo de proteínas carbonilas.....           | 59 |
| 4.14 Análises estatísticas.....                      | 60 |

## **5.0 RESULTADOS**

|   |    |
|---|----|
| 5.1 Perfil de citocinas em pacientes com MB.....  | 61 |
| 5.2 Os inibidores de APE1/Ref-1 não afetam a viabilidade e o ciclo celular e não promovem significativa fragmentação nuclear..... | 63 |
| 5.3 Células estimulados com LPS têm redução de expressão de citocinas após tratamento com E3330, resveratrol e metoxiamina.....   | 65 |
| 5.4 Resveratrol não inibe a atividade de reparo de DNA de APE1/Ref-1.....   | 67 |
| 5.5 Expressão dos níveis de APE1/Ref-1 após adição de inibidores.....   | 68 |
| 5.6 Localização celular de APE1/Ref-1 e p65 após adição de inibidores.....  | 70 |
| 5.7 Inibidores de APE1/Ref-1 diminuem o conteúdo celular de ERO e de 8-oxo-G.....   | 73 |
| 5.8 Tiorredoxina tem seus níveis reduzidos após tratamento com inibidores de APE1/Ref-1.....                                      | 74 |
| 5.9 Níveis transcricionais dos genes APE1/Ref-1 e AIF.....  | 75 |
| 5.10 Níveis de expressão protéica de APE1/Ref-1 e AIF.....  | 76 |
| 5.11 Concentração de glutamato.....   | 78 |
| 5.12 Conteúdo de proteínas carboniladas.....  | 79 |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>6.0 DISCUSSÃO.....</b> | <b>81</b> |
|---------------------------|-----------|

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>7.0 CONCLUSÃO.....</b> | <b>95</b> |
|---------------------------|-----------|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> | <b>97</b> |
|--|-----------|

## **9.0 APÊNDICE**

### **10.0 ANEXOS**

#### **10.1 Anexo 01**

## 1.0 INTRODUÇÃO

A meningite bacteriana (MB) é uma das dez principais doenças infecciosas que permanece com altas taxas de mortalidade e morbidade em todo o mundo, principalmente em países subdesenvolvidos. Nas últimas décadas, a taxa de mortalidade da MB permaneceu inalterada entre 20 e 25%, apesar dos avanços tecnológicos nos campos da antibioticoterapia. Os principais agentes etiológicos da MB são *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae tipo b* (Hib). No entanto, desde o advento da vacina anti-Hib, *S. pneumoniae* se tornou a causa mais comum de MB em crianças maiores que um ano em países desenvolvidos e em desenvolvimento.

As sequelas neurológicas geradas pela MB chegam a atingir cerca de 30-50% dos sobreviventes, sendo as lesões no ouvido interno e no parênquima cerebral as consequências mais marcantes da doença. As lesões no ouvido interno, sobretudo coclear, causam perda auditiva intensa à profunda, uni-, ou bilateral. As lesões cerebrais se refletem em síndromes sensorio-motoras, retardo mental e dificuldades de aprendizagem. As sequelas neurológicas de longo prazo resultam da destruição neuronal em virtude de uma resposta inadequada do hospedeiro, ao invés de um efeito direto do agente infeccioso "*per se*". Estas sequelas resultam da morte celular por apoptose ou necrose. Alguns estudos têm demonstrado que a morte neuronal está relacionada ao estresse oxidativo gerado pela resposta inflamatória. Dentre os danos celulares induzidos por agentes oxidativos estão as lesões de DNA, as quais são substratos para enzimas de reparo de DNA. Uma das principais vias de reparo de danos oxidados no DNA é o reparo por excisão de bases (BER). Esta via remove danos induzidos por reações químicas espontâneas, espécies reativa de oxigênio (ERO) e danos causados por uma variedade de agentes genotóxicos, e é altamente

conservada entre os organismos, desde bactérias até humanos. A ativação de enzimas de reparo de DNA durante estresse oxidativo tem sido demonstrada nas mais diversas desordens neurológicas, tais como esclerose amiotrófica lateral, doença de Alzheimer e Parkinson. Ao mesmo tempo, algumas dessas enzimas têm sido relacionadas a outras funções além do reparo, tais como a APE1/Ref-1, que também atua nos processos celulares de oxidoredução. APE1/Ref-1 já foi demonstrada ser um importante fator na redução de fatores de transcrição oxidados envolvidos com a resposta inflamatória, tais como AP-1 e NF- $\kappa$ B. Estudos com linhagens celulares submetidas a estímulos inflamatórios e após silenciamento de APE1/Ref-1 têm demonstrado redução nos níveis de TNF- $\alpha$  e CXCL8/IL-8. Por sua vez, APE1/Ref-1 pode ter um relevante papel na modulação da resposta inflamatória durante a MB.

A modulação de proteínas alvos com moléculas seguras e de baixo custo, tais como resveratrol e vitamina B6 também parecem surgir como uma estratégia terapêutica promissora na redução de sequelas geradas pela MB. Estudos recentes demonstraram um possível papel inibitório da função redox de APE1/Ref-1 pelo resveratrol, reduzindo a capacidade de NF- $\kappa$ B se ligar ao DNA. Por outro lado, estudos também têm demonstrado o papel antioxidante da vitamina B6 em diferentes situações de estresse oxidativo.

Considerando que o estresse oxidativo gerado pela resposta inflamatória é um dos principais mecanismos responsáveis pelos danos causados pela MB, portanto identificar proteínas alvos que regulem essa resposta inflamatória parece ter um importante papel na fisiopatologia da MB. Com isso, sendo APE1/Ref-1 uma proteína multifuncional que participa na regulação de fatores de transcrição da resposta inflamatória sua inibição pode ser importante na redução da inflamação e

consequentemente dos níveis de estresse oxidativo. Para isto foi realizado, neste trabalho, um estudo comparativo do perfil de citocinas expressas durante a meningite bacteriana causada pelos dois principais agentes etiológicos: *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*. Em seguida, foi realizado um estudo *in vitro*, com uma linhagem celular de monócitos estimuladas com LPS, para avaliar a expressão das citocinas após a adição de inibidores de APE1/Ref-1. E por fim, em modelo experimental de meningite pneumocócica foi avaliado o perfil de expressão de APE1/Ref-1 e do fator indutor de apoptose (*apoptosis-inducing factor* - AIF) em córtex e hipocampo após adição de vitamina B6. Esses dados contribuirão para um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos que envolvem a MB, bem como, o envolvimento da proteína APE1/Ref-1 com a resposta inflamatória.

## 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

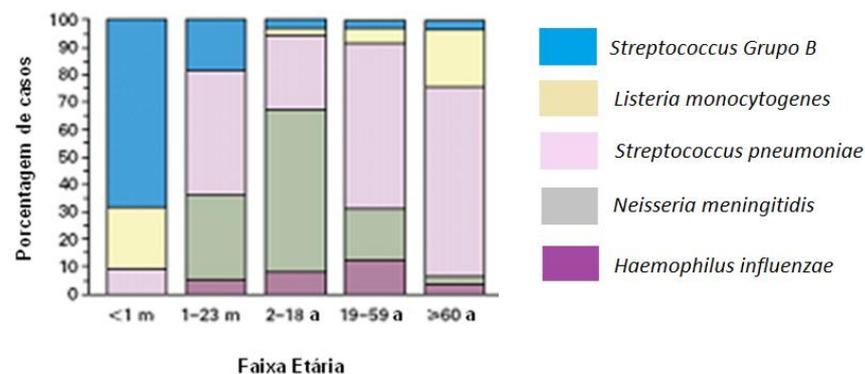
### 2.1 A meningite bacteriana

A meningite bacteriana (MB) é uma doença que afeta milhares de pessoas em todos os continentes, permanecendo como uma das principais causas de infecção relacionadas a mortes no mundo. Esta infecção tem como principal característica promover uma inflamação grave nas meninges. E apesar do uso de antibiótico ser eficiente no tratamento antimicrobiano, a MB ainda está associada com altos índices de mortalidade e morbidade (KOEDEL et al., 2002; KIM, 2003; BROUWER e VAN DE BEEK, 2012). Em cerca de 30-52% dos pacientes que sobrevivem à MB são observadas algumas sequelas, tais como surdez, anormalidade motora, epilepsia, prejuízos na aprendizagem e na memória e retardo mental (GOETGHEBUER et al., 2000; KASTENBAUER e PFISTER, 2003; VAN DE BEEK et al., 2004; WEISFELT et al., 2006). A perda auditiva durante a meningite bacteriana é a seqüela mais comum e uma das principais causas de surdez infantil (FORTNUM, 1992; RICHARDSON et al.; 1997; WELLMAN et al., 2003). Estas sequelas são conseqüências da perda neuronal no córtex e hipocampo resultante da severidade da inflamação no foco da infecção, mais especificamente no espaço subaracnóide (SCOVILLE e MILNER, 2000; WELLMER et al., 2000).

Diferentes agentes etiológicos são responsáveis por causar MB, embora nos últimos anos, principalmente após a introdução da vacinação contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), houve um significativo declínio deste patógeno, sendo atualmente *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae* os patógenos mais comuns da MB. Por outro lado, diversos microorganismos também podem levar a uma inflamação aguda ou crônica das meninges. Alguns microorganismos podem

ser destacados entre eles, *Streptococcus* grupo B, *Listeria monocytogenes* e *E. coli* K1 (KIM, 2003; LU et al., 2001; MUNOZ et al., 2007; REDMOND et al., 2007).

A incidência de MB é estimada em 2-5 casos/100000 pessoas por ano em países desenvolvidos, afetando principalmente crianças e jovens. Calcula-se ainda que este número possa ser dez vezes maior em países em desenvolvimento (MURRAY e LOPEZ, 1996; SCHUT, 2008). Além disso, cada patógeno tem uma maior taxa de incidência em grupos etários específicos como mostra a Figura 1.



**Figura 1.** Taxa de incidência dos principais patógenos causadores da meningite bacteriana em relação à faixa etária. Figura adaptada de Burri 2009.

### 2.1.1 Meningite causada por *Haemophilus influenzae* tipo b e *Neisseriae meningitidis*

*H. influenzae* tipo b (Hib) foi o principal agente causador de meningite bacteriana em crianças em todo o mundo até a introdução da vacina conjugada Hib no início dos anos 90. Desde então, a incidência de meningite causada por este agente tem sido praticamente eliminada nos países que a introduziram no seu sistema de imunização (ESKOLA, 2010). No Brasil, a inclusão desta vacina no calendário do serviço de saúde pública ocorreu em 1999, reduzindo a taxa de incidência de meningite causada por este patógeno em cerca de 70% no ano 2000 (PERECIN e BERTOLOZZI, 2004). E apesar da incidência estimada de *H. influenzae*

em São Paulo durante 2000-2008 ter sido abaixo de 1 caso por milhão de habitantes, o número de isolados de *H. influenzae* sem ser o tipo B aumentou consideravelmente nos últimos anos (ZANELLA et al., 2011).

Assim como ocorreu com a meningite por Hib, a introdução de vacinas contra *Neisseriae meningitidis* promoveu um significativo declínio no número de casos, porém, a meningite meningocócica permanece como uma doença epidêmica que afeta crianças e jovens adultos em todo o mundo, principalmente em regiões da África, onde têm sido registradas longas epidemias. A mortalidade neste tipo de meningite é considerada baixa, entretanto a infecção pode ocorrer em combinação com septicemia e elevar acentuadamente a chance de morte para o indivíduo (HODGSON et al., 2001; TEYSSOU e ROUZIC, 2007; STEPHENS et al., 2007).

Em países desenvolvidos a taxa de incidência de doenças meningocócicas é de menos de 1/100000 (França, EUA) a 4-5/100000 (Reino Unido e Espanha). E conforme os dados do SINAN/SVS/MS (Sistema Nacional de Agravos Notificáveis da Secretaria de Vigilância e Saúde, do Ministério da Saúde), a taxa de incidência média de doenças meningocócicas no Brasil no ano de 2011 foi de 1,42/100000 habitantes. Por sua vez, estudos epidemiológicos realizados nos estados do Rio Grande do Sul e da Bahia, mostraram que as taxas de incidência estão próximas aos dados reportados pelo SINAN, de aproximadamente 1,5-2,0 habitantes para cada 100000 (BAETHGEN et al., 2008; CORDEIRO et al., 2007). Apesar de há mais de duas décadas existirem vacinas de polissacarídeo contra *N. meningitidis* sorogrupo A e C, a proteção induzida durante uma epidemia torna-se limitada a sorogrupos específicos. As vacinas de polissacarídeos são seguras e possuem baixa imunogenicidade em crianças com menos de 2 anos de idade, isto vale principalmente para o sorogrupo C. Contudo, as vacinas de polissacarídeos não

induzem uma boa memória imunológica e sua proteção pode variar entre 3-5 anos (STEPHENS et al., 2007). As vacinas conjugadas para os sorogrupos A e C têm sido bastante valiosas no controle epidêmico. No entanto, sem o desenvolvimento da vacina contra o sorogrupo B se tornará difícil prevenir efetivamente as doenças meningocócicas (PACE, 2007; PRICE, 2007). Sabe-se que as vacinas contra o sorotipo B não conferem a proteção esperada e tem se tornado um grande desafio, uma vez que a cápsula da *N. meningitidis* sorotipo B possui uma estrutura semelhante às estruturas expressas no tecido neural fetal, com isso não induz uma resposta IgG efetiva (ZIMMER e STEPHENS, 2006; PIZZA et al., 2000).

### **2.1.2 Meningite causada por *Streptococcus pneumoniae***

É evidente que nos últimos anos *S. pneumoniae* tornou-se o principal agente etiológico das meningites bacterianas em indivíduos jovens e adultos em todo o mundo. No entanto, poucos estudos no Brasil têm descrito a epidemiologia da meningite causada por este patógeno. Em um estudo realizado entre o período de 1986-1992 no Rio de Janeiro, com dados do SINAN, foram notificados 694 casos de meningite, dos quais 46% confirmaram a etiologia para pneumococos (ESCOSTEGUY et al., 2004). Outro estudo desenvolvido pelo nosso grupo no hospital de referência em doenças infecciosas do Rio Grande do Norte, Giselda Trigueiro, referente ao período de 2005-2008 mostrou que aproximadamente 57% dos casos diagnosticados tiveram como agente etiológico *Streptococcus pneumoniae* (SILVA et al., 2010). Para este tipo de meningite a taxa de mortalidade no Brasil é bastante elevada, em cerca de 60% dos casos, o que é muito acima das taxas reportadas em outros países (cerca de 30%). E apesar de ser uma meningite típica de jovens e adultos, as elevadas taxas de mortalidade registradas são

relacionadas provavelmente ao grande número de crianças afetadas (de MORAES e GUEDES, 1990; BRYAN et al., 1990; FUNASA, 2002; SCHELD et al., 2002).

Uma vacina de polissacarídeos abrangendo cerca de 80% dos sorotipos responsáveis por doenças invasivas no Brasil encontra-se disponível comercialmente (BRANDILEONE et al., 1995; MANTESE, 2003). Apesar da vantagem de uma ampla cobertura, a resposta imune é de curta duração e a memória imunológica não é estabelecida, característica observada nas vacinas de polissacarídeos. Para melhorar a natureza da resposta imune, conjugados de polissacarídeos com peptídeos têm sido desenvolvidos. Deste modo, quando estes complexos antigênicos estimulam os linfócitos T-helper, é garantida uma memória imunológica mais longa ao indivíduo. Um exemplo é a vacina pneumocócica conjugada 7-valente (VCP7V da Prevenar) que promove uma proteção contra os sete principais sorotipos que causaram 73% da meningite pneumocócica em crianças nos EUA entre os períodos de 1997-2000. Portanto, a Prevenar contém polissacarídeos da cápsula dos sorotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, e 23F) conjugado com uma variante não tóxica da toxina diftérica (BYINGTON, 2005; BLACK et al., 2000).

## **2.2 Fisiopatologia da MB**

Diversas etapas de interações entre a bactéria e o hospedeiro marcam o processo infeccioso durante a MB. De modo geral, o processo inicia com a colonização do patógeno na nasofaringe. Em seguida, após escapar do sistema de defesa presente na mucosa do hospedeiro, tais como muco, lisozima, IgA e componentes do sistema complemento, o patógeno invade a mucosa e se prolifera no espaço intravascular (MOOK-KANAMORI et al., 2011). Neste momento, o patógeno consegue ultrapassar mais uma vez os mecanismos de defesa hospedeira

no espaço intravascular e atravessar a barreira hematoencefálica utilizando-se de moléculas de adesão, e alcançando assim o espaço subaracnóideo (RADIN *et al.*, 2005; ORIHUELA *et al.*, 2004). Em seguida, a proliferação bacteriana no sistema nervoso central (SNC), bem como, a produção de outras moléculas liberadas pelos patógenos tais como, a pneumolisina, induzem a ativação de células de defesa presentes no local. Por sua vez, estas células promovem a liberação de moléculas pró-inflamatórias aumentando a permeabilidade da barreira hematoencefálica e atraindo um grande número de leucócitos para o líquido cefalorraquidiano (LCR), processo este denominado pleocitose (KIM, 2003; KOEDEL *et al.*, 2002a). Citocinas, quimiocinas, ERO, espécies reativas de nitrogênio e metaloproteinases de matrix (MMPs) são algumas moléculas que atuam promovendo o rompimento da barreira hematoencefálica (ZWIJNENBURG *et al.*, 2001; HABERL *et al.*, 1994; van FURTH *et al.*, 1996; LEPPERT *et al.*, 2000). Por conseguinte, estas moléculas além de modular a inflamação, causam diretamente diferentes tipos de injúrias cerebrais, bem como, são responsáveis por induzir mecanismos secundários capazes de causar danos aos neurônios, tais como o acúmulo de metabólitos neurotóxicos da rota da quinurenina do metabolismo do triptofano, e a ativação de proteínas de reparo do DNA como a polimerase de poli-ADP ribose 1 (PARP-1), que leva a depleção da energia celular e a consequente morte neuronal (KOEDEL *et al.*, 2002b; LEIB e TÄUBER, 1999; BRANDTZAEG e van DEUREN *et al.*, 2002; BELLAC *et al.*, 2006; KOEDEL e PFISTER, 1999).

A apoptose mediada via caspase-3 é o principal tipo de morte celular no hipocampo durante MB causada por *S. pneumoniae*, embora apoptose por vias independente de caspase-3 também tem sido observada em neurônios maduro e imaturo do giro dentado do hipocampo (LEIB *et al.*, 1996; GIANINAZZI *et al.*, 2003;

BIFRARE et al., 2003). Uma das principais proteínas envolvidas na apoptose de maneira independente de caspase-3 é o fator indutor de apoptose (AIF). AIF é uma flavoproteína presente na mitocôndria que sob condições fisiológicas normais participa dos processos de oxi-redução da mitocôndria, porém após a permeabilização da membrana externa mitocondrial causada por algum efeito patológico, a proteína é translocada ao núcleo e causa uma condensação da cromatina e fragmentação do DNA de maneira independente de caspase (KRANTIC et al., 2007). Esta flavoproteína tem sido bastante associada a morte neuronal após ativação de receptores neuronais pelo glutamato. O glutamato é o principal aminoácido neurotransmissor que em altas concentrações causa morte neuronal. O acúmulo deste aminoácido no cérebro tem sido observado em algumas desordens como a doença de Alzheimer (ZHANG e BHAVNANI, 2006; KRANTIC et al., 2007; YU et al., 2010)

### **2.2.1 Moduladores da resposta imune na MB**

Diversos fatores influenciam a resposta inflamatória ao longo do processo infeccioso da MB. Durante a multiplicação bacteriana normalmente alguns pneumococos sofrem autólise, conseqüentemente os produtos bacterianos liberados são bastante imunogênicos e disparam uma forte resposta inflamatória no indivíduo (TOMASZ et al., 1988; TUOMANEN et al., 1985). Da mesma forma, os antibióticos bacterianos que promovem lise do patógeno causam um efeito muito semelhante, com isso disparam uma forte resposta inflamatória, bem como, aumentam a gravidade da doença (NAU e EIFFERT, 2002).

No início da infecção, logo após a invasão e superação das primeiras barreiras de defesa, uma resposta imunológica é ativada por células gliais,

endoteliais e macrófagos residentes do SNC, sendo caracterizada pela produção e liberação de mediadores inflamatórios, tais como citocinas e quimiocinas (KOEDEL et al., 2002; VAN FURTH et al., 1996; TÄUBER e MOSER, 1999). Dentre estas, TNF- $\alpha$  é uma citocina encontrada em quantidade bastante elevada durante a MB e é responsável por mediar muitas funções durante a resposta ao patógeno, incluindo a geração de inflamação neutrofílica, aumento do metabolismo cerebral, consumo de oxigênio e aumento do fluxo de sangue cerebral (LEIB et al., 2001). Por sua vez, IL-1 $\beta$  também tem sido observada no LCR de pacientes com MB e sua concentração elevada tem sido relacionada a um pior prognóstico da doença (WAAGE et al., 1989). IL-6, um potente indutor das proteínas da fase aguda, febre, leucocitose e ativação do complemento, tem sido observada em níveis elevados nos pacientes com MB (HIRANO et al., 1990). Em resposta a ativação dos receptores TNF pela citocina TNF- $\alpha$ , ocorre a liberação do fator de transcrição NF $\kappa$ B que vai para o núcleo e promove a transcrição de diversos moduladores proinflamatórios, entre eles CXCL8/IL-8, CCL3/MIP1- $\alpha$ , CCL4/MIP1- $\beta$  e o próprio TNF- $\alpha$ .

A CXCL8/IL-8 é uma quimiocina tendo como função básica a ativação e atração de células brancas para o foco da inflamação. Esta também participa da resposta imune da MB aumentando a adesão neutrofílica sobre as células endoteliais, pré-requisito importante para a invasão de leucócitos dentro do SNC (SPRENGER et al., 1996). Outras quimiocinas tais como, a proteína monócito quimioatraente 1 (CCL2/MCP-1) também é importante por atrair neutrófilos e células da linhagem monocítica (SPRENGER et al., 1996; DIAB et al., 1999).

Na tentativa de controlar e atenuar a resposta inflamatória, citocinas tais como IL-10 e IL-1 receptor antagonista (Ra), são expressas e liberadas pelos leucócitos (KORNELISSE, 1996; van DEUREN, 1997). Por exemplo, a IL-10 responsável por

inibir a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8/CXCL8 e atenuar edemas cerebrais durante a meningite. Além de modular a inflamação no espaço subaracnóide (PARIS et al., 1997). Enquanto isso, alguns mediadores inibem a ligação de citocinas pró-inflamatórias aos seus respectivos receptores celulares, por exemplo IL-1Ra o qual restringe a ligação de IL-1 $\beta$  aos seu receptor (van DEUREN et al., 1997). Apesar da redução da resposta inflamatória ser um evento fundamental, especialmente nos casos em que essa resposta ocorre de forma excessiva, os baixos níveis de TNF- $\alpha$  e de outros moduladores inflamatórios no início da infecção parecem ser um importante fator associado a uma aumentada susceptibilidade a MB (ECHCHANNAOUI et al., 2002; ZWIJNENBURG et al., 2003).

As citocinas inflamatórias também induzem as células a produzirem ERO, tais como anion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e óxido nítrico no SNC (KASTENBAUER et al., 2002b). As ERO também fazem parte do arsenal microbicida dos fagócitos polimorfonucleares e mononucleares contra os patógenos. No entanto estas moléculas oxidantes têm sido implicadas em danos a outras biomoléculas, tais como DNA, proteínas e lipídeos (SCHELD et al., 2002). Por isso, têm sido acumuladas evidências do papel da resposta imune na geração de estresse oxidativo, que induzem a danos neuronais e a ativação de uma série de vias metabólicas que podem ser prejudiciais ao organismo (KLEIN et al., 2006).

Apesar da expressão de citocinas estar bem definida durante a MB, elas têm sido estudadas independente dos tipos de patógenos causadores da infecção, considerando que todos eles ativam os mesmos receptores toll-like (TLRs) (ASANO et al., 2010; FIDA et al., 2006b). No entanto, *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* parecem modular diferentes TLRs que conseqüentemente podem regular uma diferente expressão de citocinas (OSTERGAARD et al., 2009; MOGENSEN et al.,

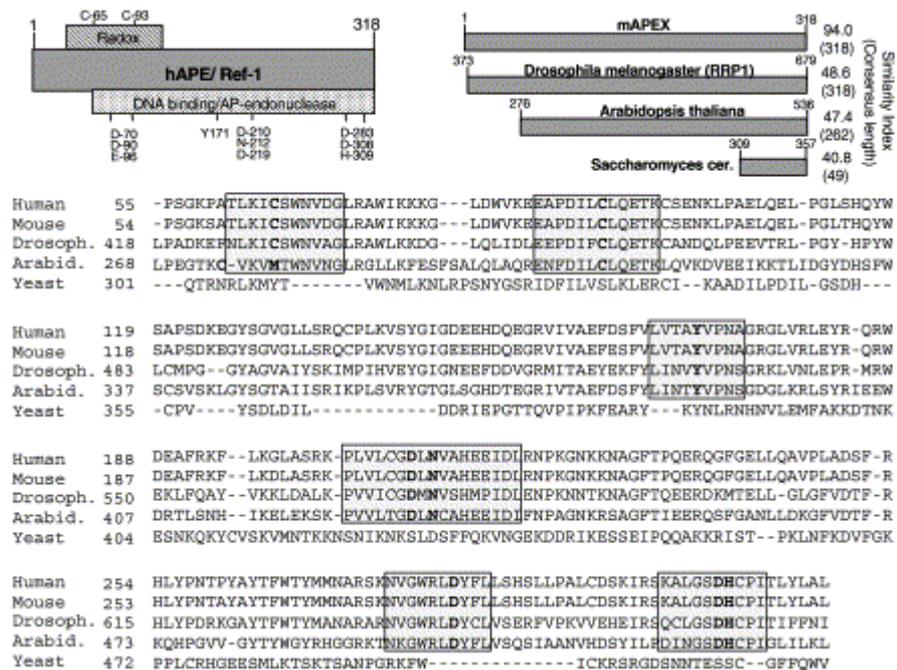
2006). Os TLR2, TLR4 e TLR9 são importantes na resposta contra *S. pneumoniae*, enquanto que o TLR2 não parece ser tão essencial na resposta a *N. meningitidis* (RIBES et al., 2010; SJOLINDER et al., 2008). Além disso, ensaios comparando os níveis de RNA mensageiro de citocinas após meningite causada por *S. pneumoniae* e *H. influenzae* mostraram padrões de expressão específicos por patógenos (DIAB et al., 1999). Por outro lado, alguns mediadores de quimioatração, tais como CXCL8/IL-8, CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL2/MCP-1 não demonstram diferenças significativas entre *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* e *H. influenzae* tipo b (MASTROIANNI et al., 1998). Portanto, um estudo mais claro do padrão da resposta imune da meningite bacteriana causada por diferentes patógenos pode contribuir para um melhor entendimento da fisiopatologia da infecção frente a diferentes patógenos, bem como, para uma terapia antiinflamatória mais específica.

### **2.3 APE1/Ref-1: um alvo terapêutico na redução da resposta inflamatória durante MB**

A endonuclease apurínica/apirimidínica 1 (APE1), ou fator efetor redox (Ref-1), é uma enzima multifuncional envolvida no reparo de sítios apurínicos/apirimidínicos (AP) no DNA, na ativação redox de diversos fatores de transcrição, tais como Fos, Jun, NF $\kappa$ B e p53, e é um repressor transcricional de seu próprio gene e do gene do hormônio da paratireóide (PTH) (KANE et al., 1981; HIROTA et al., 1997; MITOMO et al., 1994; JAYARAMAN et al., 1997; OKAZAKI et al., 1994).

APE1/Ref-1 pertence a família exonuclease III, sendo conservada de bactéria a humanos. Em eucariotos houve o surgimento do domínio redox ao longo do processo evolutivo. Desta forma, os domínios funcionais relacionados a reparo de

DNA e ativação redox possuem alta identidade em humanos, camudongos, *Drosophila* e mesmo em *Arabidopsis* (Figura 2). Por outro lado, a sequência gênica da AP endonuclease de levedura difere claramente das outras espécies de eucariotos fazendo parte de outra família de endonuclease (FRITZ et al., 2003).



**Figura 2.** Representação esquemática do alinhamento das seqüências da proteína APE1/Ref-1 em diferentes organismos mostrando o grau de similaridade entre eles em relação a proteína humana. Figura retirada de Fritz et al., 2003.

O gene APE/Ref-1 é ativado por níveis subletais de ERO e a expressão da APE/Ref-1 parece correlacionar com a sensibilidade celular ao estresse oxidativo (FRITZ et al., 2003; BERNSTEIN et al., 2002). Algumas evidências têm indicado o envolvimento da APE1 em apoptose, além disso, um aumento dos níveis protéicos e mudanças na localização celular têm sido correlacionados com alguns tipos de tumores, como de ovário, cervical, de próstata e de células germinais (KELLEY et

al.,1998, 2000; XU et al., 1997). Em injúrias cerebrais isquêmicas ou traumáticas, a redução da expressão de APE1/Ref-1 precede a fragmentação do DNA e a apoptose, sugerindo que quando as células disparam a apoptose, possivelmente devido a danos excessivos no DNA, a expressão de APE1/Ref-1 é reduzida (LEWEN et al., 2001; EDWARDS et al., 1998).

Além disso, a resposta inflamatória a determinados agentes infecciosos, como *Helicobacter pylori*, parece ser modulada pela APE1/Ref-1, uma vez que foi observada redução significativa de CXCL8/IL-8, bem como inibição da ligação ao DNA pelos fatores de transcrição NF $\kappa$ B e AP-1 (O'HARA et al., 2006). A atividade redox de APE1/Ref-1 é responsável por mediar a translocação nuclear de NF $\kappa$ B em macrófagos induzidos por LPS (SONG et al., 2007). Devido a suas funções, APE1/Ref-1 tem sido investigada como um alvo promissor nas terapias anti-câncer e antiinflamatórias (FISHEL e KELLEY, 2007).

Nos últimos anos novas funções têm sido atribuídas a APE1/Ref-1, tais como sua capacidade de interagir com a nucleofosmina 1 (NPM1) no nucléolo participando no processo de controle de qualidade do RNA ribossômico, seu papel de reparo nos promotores de transcrição após a ação da demetilase LSD1, bem como, sua atividade chaperona redox que permite a redução de fatores de transcrição juntamente com a proteína TRX1(VASCOTTO et al., 2009; PERILLO et al., 2008; ANDO et al., 2008).

Como estas diferentes funções fisiológicas são coordenadas ainda é pobremente entendido. Além de variações nos níveis de expressão de APE1/Ref-1, modificações pós-traducionais na proteína estariam associadas com essas diferentes funções (LUO et al., 2008). Por exemplo, a ubiquitinação de APE1/Ref-1

mediada pela ubiquitina E3 ligase MDM2 após tratamento com peróxido de hidrogênio mostrou diminuir os níveis de APE1/Ref-1 e dirigí-la a degradação (BUSSO et al., 2009). Além disso, uma forma truncada de APE1/Ref-1 (34 kDa), caracterizada pela clivagem do sinal de localização nuclear (NLS) foi mostrada possuir significativa atividade de endonuclease e clivar o DNA da cromatina após estímulo apoptótico (YOSHIDA et al., 2003). Outras modificações em APE1/Ref-1 tais como acetilação, fosforilação, S-nitrosilação também são observadas. A fosforilação da APE1/Ref-1 pela caseína quinase II foi demonstrada inibir a atividade de reparo, embora não afete a função redox da proteína. Por outro lado, a acetilação de APE1/Ref-1 não interfere na atividade de reparo da proteína, mas tem um papel fundamental na regulação da expressão de genes como o paratormônio. Enquanto que a S-nitrosilação das Cys 93 e 310 parece estar envolvida com o transporte nuclear da APE1/Ref-1 (QU et al., 2007; BHAKAT et al., 2003; YACOUB et al., 1997). Entretanto até os mecanismos de modificações pós-traducionais de APE1/Ref-1 e seus efeitos funcionais são pouco compreendidos.

### **2.3.1 APE1/Ref-1: atividade de reparo de DNA**

APE1/Ref-1, a principal enzima em humanos responsável pelo reparo de sítios AP, foi originalmente purificada e caracterizada como uma proteína monomérica (KANE e LINN, 1981). Posteriormente, dois grupos de pesquisa independentes clonaram e caracterizaram a enzima de reparo de DNA, APE1/Ref-1, como uma endonuclease capaz de clivar a ligação fosfodiéster na posição 5' do DNA, adjacente ao sítio AP (DEMPLE *et al.*, 1991; ROBSON e HICKSON, 1991).

As “AP” endonucleases da família exonuclease III possuem atividade de hidrólise do sítio AP, bem como, 3' diesterase. Destas, APE1/Ref-1 é a enzima que

possui a maior taxa de atividade 5' endonuclease, e a que possui a menor atividade 3' diesterase (EVANS et al., 2000).

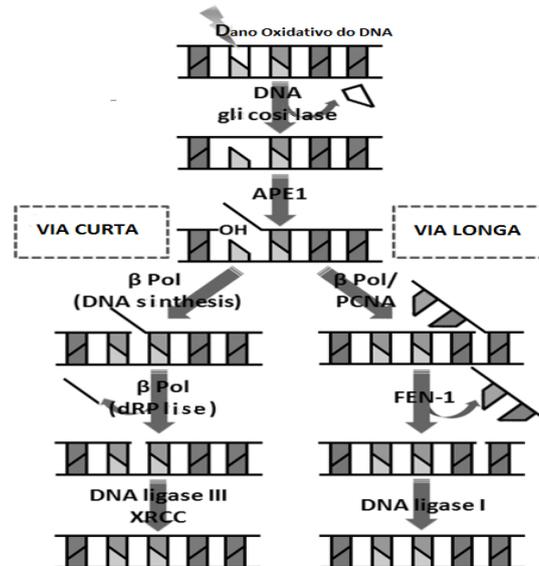
A atividade de reparo de DNA de APE1/Ref-1 localiza-se no domínio C-terminal da proteína. Esta região possui identidade de 25% - 40% com os homólogos procariotos (Figura 2), em contraste, possui alto grau de similaridade entre as endonucleases de mamíferos, sugerindo que estas proteínas são evolutivamente muito próximas (EVANS et al., 2000).

Os sítios AP no DNA podem ser formados por hidrólise espontânea de uma base (LINDAHL e LJUNGQUIST, 1975), ou como um intermediário do reparo por excisão de bases (BER) que atua sobre bases modificadas. Essas modificações de base podem ocorrer durante o metabolismo celular ou por agentes exógenos (FRIEDBERG et al., 1995), principalmente por agentes alquilantes (LUTZ et al., 1990; LINDAHL et al., 1993) ou ERO que causam oxidação de bases (AMES, 1989; AMES e GOLD, 1991).

O acúmulo de danos em bases, especialmente de bases oxidadas, tem sido implicado em uma variedade de desordens, incluindo câncer (POULSEN et al., 1998; WARIS e AHSAN, 2006), doenças neurodegenerativas (PRATICO et al., 2005), aterosclerose (MARTINET et al., 2002) e envelhecimento (HARMAN et al., 1992). Por sua vez, vias de reparo de DNA atuam na restauração da integridade do genoma, entre elas o BER é a via especializada na retirada de bases danificadas.

O BER possui duas subvias de reparo de bases, conhecidas como via curta (SP-BER) e via longa (LP-BER). O mecanismo exato pelo qual a rota será escolhida continua sob investigação, todavia parece que APE1/Ref-1 possui um papel muito importante nesta seleção (BALAKRISHNAN et al., 2009). No entanto, essas vias têm sido identificadas de acordo com o número total de nucleotídeos que são

substituídos durante o reparo. Na SP-BER ocorre a substituição de um único nucleotídeo, enquanto que na LP-BER ocorre a substituição de dois ou mais nucleotídeos. APE1/Ref-1 é central nas duas vias. Além de clivar o sítio abásico em si, interage com diversas proteínas presentes tanto na via longa quanto na via curta do BER (FAN e WILSON, 2005). O reparo SP-BER inicia com uma DNA glicosilase clivando a ligação N-glicosídica da base danificada resultando em um sítio abásico (LINDAHL 1982, 1993). Subsequentemente, APE1/Ref-1 promove uma incisão na fita de DNA danificada na região 5' do sítio abásico, gerando uma lacuna de um nucleotídeo, e expondo uma hidroxila na posição 3' e um deoxiribose fosfato (dRP) na posição 5' (DOETSCH e CUNNINGHAM, 1990; MOSBAUGH e BENNETT, 1994). A DNA polimerase  $\beta$  (pol  $\beta$ ) preenche o espaço e remove o grupo dRP com sua atividade dRP liase (MATSUMOTO e KIM, 1995; PIERSEN et al., 1996; SRIVASTAVA et al., 1998). A integridade da fita reparada é finalmente restaurada pela ação da ligase de DNA. Alternativamente, se o grupo dRP sofrer alguma alteração, seja uma oxidação ou redução, e não puder ser removida pela atividade liase da polimerase, o reparo será desviado para a LP-BER envolvendo a substituição de 2-10 nucleotídeos da fita danificada (DIANOV et al., 1992; MATSUMOTO et al., 1994). Na LP-BER, DNA pol  $\beta$  e/ou pol  $\delta/\epsilon$  realiza uma síntese de 2 a 10 nucleotídeos, promovendo um deslocamento nos nucleotídeos da fita danificada gerando um *flap* (uma sobra ou protuberância) contendo um grupo dRP na posição 5' que é subsequentemente clivado pela endonuclease *flap* 1 (FEN1) e o nucleotídeo é unido pela DNA ligase I (Figura 3).

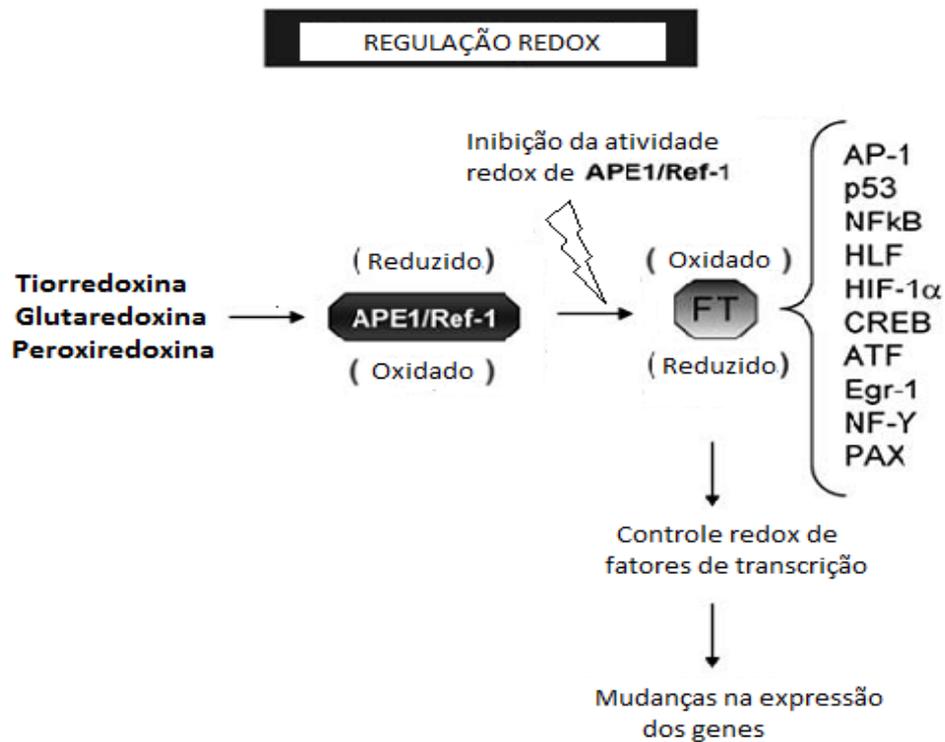


**Figura 3.** Principais proteínas envolvidas na via curta e longa do BER, e a participação de APE1/Ref-1 nas duas vias. Na via curta, a ação de uma DNA glicosilase gera substrato para a AP endonuclease que promove uma incisão no sítio AP. O grupo dRP gerado após a incisão de APE1/Ref-1 ditará as proteínas que irão atuar posteriormente. Na via curta, as proteínas que completam o BER são a DNA pol  $\beta$  e a Ligase I ou Ligase III/XRCC1, enquanto que, na via longa, a DNA pol  $\beta$  e/ou pol  $\delta/\epsilon$ , juntamente com FEN1 e a Ligase I concluem o reparo do DNA. Figura adaptada de Li et al., 2011.

### 2.3.2 APE1/Ref-1: atividade redox

Reações de redução/oxidação (redox) são conhecidas por regular importantes processos celulares. APE1/Ref-1 é uma proteína chave na regulação redox sendo reduzida por tioredoxina (TRX), um fator redox essencial por reduzir diversos fatores de transcrição que regulam a expressão de proteínas, entre elas proteínas de reparo de DNA. Em uma pesquisa para identificar o fator nuclear responsável por reduzir o fator de transcrição AP-1, APE1/Ref-1, foi identificada (XANTHOUDAKIS et al., 1992, 1996). Desde esta descoberta inicial, APE1/Ref-1 tem sido mostrada

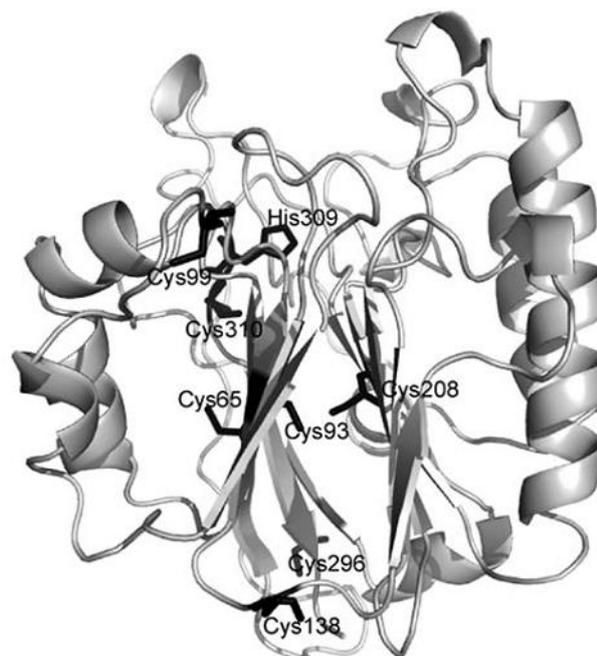
reduzir um grande número de fatores de transcrição importantes, incluindo NFκB, HIF-1a, p53, PAX, e outros como mostra a Figura 4 (SONG et al., 2008; CAO et al., 2002; EMA et al., 1999; HIROTA et al., 1997, 1999; LANDO et al., 2000; TELL et al., 2002; UENO et al., 1999).

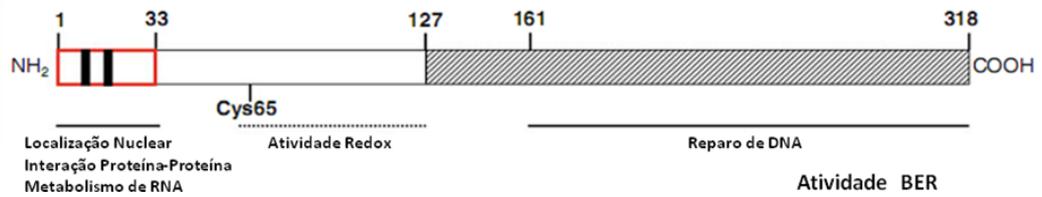


**Figura 4.** Fatores de transcrição que são reduzidos pela função redox de APE1/Ref-1. A proteína APE1/Ref-1 devido a sua capacidade redox permite que fatores de transcrição tais como AP-1, NFκB, p53, HIF, além de outros sejam reduzidos e liguem-se ao DNA permitindo a transcrição de diversos genes. Figura adaptada de Luo et al., 2010.

Dados indicam que a região dos primeiros aminoácidos 33–35 de APE1/Ref-1 é um subdomínio estrutural e funcional que atuaria como uma sequência importante na interação proteína-proteína ou proteína-RNA (VASCOTTO et al., 2009). Utilizando ensaios *in vitro* tem sido demonstrado que a região N-terminal compreendida entre os aminoácidos 43 e 65 é necessária para APE1/Ref-1 atuar

como fator redox. Os dados estruturais indicam que esta região forma uma alça estendida promovendo interações, tais como ligações de hidrogênio e pontes salinas, com o núcleo globular da molécula. A Cisteína 65 (Cis65) é o principal aminoácido implicado na atividade redox de APE1/Ref-1 (WALKER et al., 1993) e está localizado sobre a folha beta 1 com o lado da cadeia apontando para um bolso hidrofóbico e distante da folha beta central (Figura 5). Cálculos de acessibilidade com solventes mostram que Cis65 é inacessível ao solvente e seria, portanto, incapaz de interagir diretamente com resíduos de outras proteínas. Como a estrutura da APE1/Ref-1 mutada C65A parece similar a proteína selvagem, é provável que a estrutura cristalizada não represente a molécula no estado redox ativo. Foi proposto que APE1/Ref-1 pode sofrer uma mudança conformacional, que envolve a exposição da Cis65 e cria um sítio de ligação que acomodará os fatores de transcrição (GEORGIADIS et al., 2008).





**Figura 5.** Estrutura terciária de APE1/Ref-1 evidenciando as cisteínas presentes na proteína e esquema da proteína mostrando os domínios redox e de reparo de DNA e a região dos primeiros aminoácidos que estaria envolvida com outras atividades de APE1/Ref-1. Figura adaptada de Luo et al., 2010 e Tell et al., 2010.

O estresse oxidativo representa uma ameaça comum para todos os organismos aeróbicos. Praticamente todas as enzimas capazes de metabolizar oxigênio gera ERO, tais como o anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (HALLIWELL, 1999). Portanto, o balanço redox celular é mantido por um conjunto de sistemas enzimático (tais como catalase, peroxidases, superóxido dismutase) e não-enzimático (tais como, glutathiona, ácido ascórbico, tocoferol) que permitem que uma condição redutora prevaleça (TELL et al., 2005). Produção de ERO em um nível sub-tóxico pode levar a alterações no estado redox celular e extracelular, e estas alterações são importantes para sinalizar mudanças em funções celulares. Os grupos tíóis, por sua habilidade de oxidação reversível, podem atuar de maneira sensível ao redox, portanto sendo responsáveis por uma variedade de eventos de sinalização mediados por ERO (MORAN et al., 2001).

A regulação redox de AP-1 é resultante da oxidação/redução de resíduos de cisteína conservados dentro dos domínios de ligação-DNA de c-Jun e c-Fos (XANTHOUDAKIS *et al.*, 1992, 1994, 1996). Além do fator de transcrição AP-1, a investigação da regulação redox de p53 foi iniciada baseada nos achados que a p53 oxidada se ligava muito pobremente ao DNA (HAINAUT et al., 1993), levando a

descoberta que APE1/Ref-1 foi o fator responsável por aumentar a atividade de ligação ao DNA da p53 selvagem (JAYARAMAN et al., 1997).

O mecanismo pelo qual APE1/Ref-1 aumenta a atividade de p53 não tem sido completamente elucidado, mas tem sido proposto incluir a ativação redox do domínio de ligação ao DNA, potencialmente através da redução direta da ponte dissulfeto, bem como, uma interação independente da função redox com o domínio regulatório C-terminal de p53 (JAYARAMAN et al., 1997). Posteriormente, APE1/Ref-1 foi mostrado interagir com o domínio de tetramerização, promovendo a formação de tetrâmeros a partir de dímeros e, portanto aumentando a atividade de ligação ao DNA de p53 através de um mecanismo independente da função redox (HANSON et al., 2005).

### **2.3.3 Efeito de polimorfismos de APE1/Ref-1 sobre a resposta inflamatória durante MB**

Os polimorfismos genéticos em genes de reparo de DNA têm mostrado influenciar a resposta de pacientes no tratamento contra o câncer e têm sido associados com o risco a diversas desordens relacionadas à idade, porém poucos estudos têm associados os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) de genes de reparo a susceptibilidade a doenças infecciosas.

Diversos estudos examinaram o efeito de polimorfismos no gene da APE1/Ref-1 humana. HADI et al., (2000) descreveram sete SNPs no gene de APE1/Ref-1. O alelo, 148 Asp/Glu, é a variante mais frequente no gene de APE1/Ref-1. Enquanto a substituição 148 Asp/Glu não resultou em qualquer diferença detectável nas atividades de APE1/Ref-1 (HADI et al., 2000; DAVIET et al., 2007), o mesmo SNP tem mostrado afetar o crescimento celular e a sensibilidade a radiação ionizante se combinado com o alelo de XRCC1 R399Q, e aumentou marcadamente o risco de

câncer de mama (HU et al., 2001, 2002). Jiao et al., (2006) também mostraram uma alta predisposição de indivíduos carregando a combinação dos SNPs de APE1/Ref-1 148 Asp/Glu e XRCC1 R194W ao risco de câncer pancreático. Atualmente não está claro como esses SNPs, em particular, influenciam o crescimento celular e o risco ao câncer, embora seja plausível que a posição em que eles se encontram possam ter importância na interação entre APE1/Ref-1 e XRCC1.

APE1/Ref-1 possui três SNPs não sinônimos dos quais somente 148 Asp/Glu tem uma frequência alélica >5% (<http://egp.gs.washington.edu/data/apex/apexx.pph-sift.txt>). Estudos prévios mostraram que a variante genotípica APE1/Ref-1 148 Asp/Glu não afetou a frequência de aberrações cromossômicas induzidas por raios X ou ultravioleta (AU et al., 2003). Entretanto os indivíduos carregando o alelo Glu apresentaram uma maior sensibilidade à radiação ionizante do que aqueles que carregam o alelo Asp (HU et al., 2001). Um número de estudos caso-controle tem examinado a associação entre polimorfismos de APE1/Ref-1 e a susceptibilidade ao câncer. Por outro lado, poucos estudos tem associado o polimorfismo de APE1/Ref-1 a outras doenças.

Em pacientes com doença de Alzheimer, bem como, com esclerose lateral amiotrófica, o SNP APE1/Ref-1 (Asp148Glu) não se mostrou associado com o risco de desenvolvimento da doença, indicando que este polimorfismo não tem um papel principal na etiopatogênese dessas doenças (COPPEDE et al., 2010; PARILDAR-KARPUZOĞLU et al., 2008). No entanto, na doença de Parkinson, essa variante polimórfica associada com polimorfismo em outras enzimas de reparo mostrou ser um fator de risco para o desenvolvimento da doença (GENCER et al., 2012).

Recentemente nosso grupo estudou a associação de SNPs em enzimas de reparo de DNA com diversos fatores envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos da

meningite bacteriana. Neste estudo houve uma frequência aumentada do alelo APE1/Ref-1 (Asp148Glu) em pacientes com MB, bem como, redução nos níveis de IL-6, IL-1Ra, MCP-1/CCL2 e CXCL8/IL-8 na presença do alelo (da SILVA et al., 2011). Esses dados sugerem um possível papel de APE1/Ref-1 e da influência de seu polimorfismo na regulação da resposta imune durante a meningite bacteriana.

### **2.3.4 Inibidores de APE1/Ref-1**

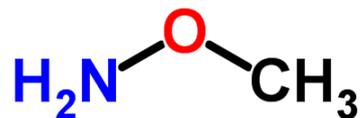
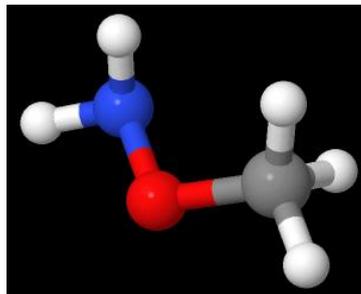
Estudos prévios demonstram que a diminuição nos níveis de APE1/Ref-1, usando oligonucleotídeos anti senso ou RNA de silenciamento, leva a um bloqueio do crescimento celular e o aumento da sensibilidade celular a agentes que causam danos ao DNA (FISHEL et al., 2007, 2008; LAU et al., 2004; ONO et al., 1994; WANG et al., 2004). Ainda não é conhecida a importância relativa da função redox e de reparo no câncer. Estudos para determinar os efeitos da inibição de cada uma das funções, redox e reparo, estão sendo desenvolvidos. A capacidade de atingir uma proteína específica por uma droga ou agente químico (através do uso de uma pequena molécula inibidora), particularmente uma que possui um importante papel na resposta celular ao estresse pode ter relevante importância na terapia de diversas doenças.

#### **2.3.4.1 Metoxiamina**

Metoxiamina é uma molécula que tem como alvo os sítios AP afetando a atividade de APE1/Ref-1 (Figura 6). Por sua vez, metoxiamina tem mostrado potencializar a citotoxicidade de uma ampla faixa de agentes que danificam o DNA devido à ligação direta desta molécula aos sítios AP. Este químico é capaz de reagir com o átomo C1 do aldeído do sítio AP e tem mostrado potencializar a radiosensibilidade mediada pela 5-Iodo-2'-deoxiuridina (TAVERNA et al., 2003).

Estudos clínicos de fase I combinando metoxiamina e permetrex têm sido realizados em pacientes com câncer refratário avançado e tem mostrado resultados promissores no tratamento anti-tumoral (ANTHONY et al., 2009).

MX potencializa a citotoxicidade de agentes alquilantes, tais como temozolomida em linhagens celulares de câncer humano (FISHEL et al., 2007; LIU et al., 2002; RINNE et al., 2004; TAVERNA et al., 2001). Os sítios AP aduzidos com MX são intermediários estáveis e resistentes a clivagem pela APE1 e são refratários a atividade dRPase/liase da DNA polimerase (HORTON et al., 2000).

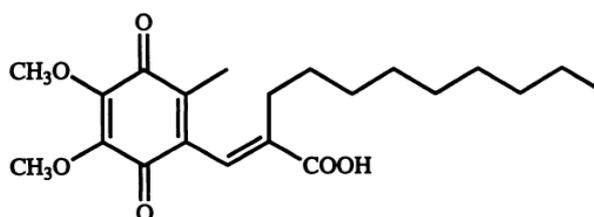


**Figura 6.** Estrutura tridimensional (3D) da metoxiamina e estrutura química mostrando os átomos envolvidos. Imagem retirada de (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3970.html>) .

#### 2.3.4.2 E3330 e Resveratrol

Além dos inibidores da atividade de endonuclease de APE1/Ref-1 possuírem um papel potencial nas terapias contra câncer, outros inibidores tais como, os que inibem a função redox têm surgido. Recentemente, foi demonstrado que o (E)-3-(5,6-dimetoxi-3-metil-1,4-dioxociclohexa-2,5-dienil)-2- ácido nonilpropenóico (E3330)

(Figura 7) bloqueia a função redox de APE1/Ref-1 sobre o fator de transcrição AP-1 em células de câncer de ovário (LUO et al., 2008). Além de AP-1, foi demonstrado que E3330 também bloqueou a atividade redox de APE1/Ref-1 com o fator indutível de hipoxia (HIF) -1 $\alpha$  e outros fatores de transcrição regulados por APE1/Ref-1 (Figura 4). Isto permite dizer que o efeito da inibição redox não é específico para um único fator de transcrição (ZIEL ET AL., 2004). O mecanismo que explica o efeito inibitório de E3330 sobre APE1/Ref-1 permanece desconhecido embora algumas propostas tenham sido apresentadas. Por exemplo, um estudo usando espectrometria de massa e modificação química observou que E3330 promovia modificações nos resíduos de Cys de APE1/Ref-1. Estas modificações seriam resultantes da exposição da C65 da APE1/Ref-1 ao solvente (SU et al., 2011). Por outro lado, também foi proposto que a incubação de APE1/Ref-1 com E3330 leva a formação de pontes dissulfetos entre diferentes cisteínas, tais como C65–C93, C65–C99, C65–C138, C93–C99, C93–C138 (GORMAN et al., 1997).



**Figura 7.** Estrutura química do (E)-3-(5,6-dimetoxi-3-metil-1,4-dioxociclohexa-2,5-dienil)-2-ácido nonilpropenóico (E3330). Imagem retirada de GOTO et al., 2005.

Embora E3330 bloqueie a função redox de APE1/Ref-1, ele não teve efeito sobre a atividade de endonuclease da proteína de reparo APE1/Ref-1 (LUO et al., 2008). Também foi demonstrado que essa molécula inibitória tem potencialidades

sobre a morte de células tumorais em uma variedade de linhagem celulares de cânceres, tais como ovariano, colón, pulmão, mama, cérebro, pâncreas, próstata e mieloma múltiplo, porém não mostrou morte significativa em células normais, tais como células embrionárias hematopoiéticas, células endoteliais vasculares da retina (RVECs), e células humanas CD34<sup>+</sup> progenitoras (LUO et al., 2010). Estes dados mostram que o papel redox de APE1/Ref-1 atinge o câncer, mas não a sobrevivência de células normais.

Outras moléculas com potencial para inibir a função redox de APE1/Ref-1 têm surgido. Por exemplo, as isoflavonas de soja são possíveis agentes quimioprotetores em câncer de próstata (HORIE, 2012; MESSINA et al., 2006). Linhagem de células de câncer de próstata PC-3 e camundongos apresentando tumores e tratadas com isoflavonas de soja tiveram uma aumentada morte celular, reduzida ligação de NFκB ao DNA e níveis reduzidos de APE1/Ref-1, após uso de radiação. Os autores concluíram que isoflavona de soja diminuiu os níveis de APE1/Ref-1 e subsequentemente resultou em uma redução na capacidade de APE1/Ref-1 reduzir NFκB, resultando na incapacidade das células responderem ao estresse (RAFFOUL et al., 2007).

Outro produto natural, o resveratrol, componente das uvas e de outras frutas vermelhas, foi relatado afetar a atividade redox de APE1/Ref-1 (YANG et al., 2005). Resveratrol foi mostrado inibir tanto a atividade endonuclease de APE1/Ref-1 quanto à atividade de ligação ao DNA de AP-1 em extratos celulares, presumivelmente através da inibição da função redox de APE1/Ref-1. Com isso, o resveratrol tem sido estudado em terapias anti-inflamatórias. Em que, atenua a ativação de células imunológicas e posterior síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios, através da inibição dos fatores de transcrição como a AP-1 (DAS e DAS, 2010).

Também foi mostrado que o resveratrol inibe a ativação da microglia e reduz a produção de fatores pró-inflamatórios. Inúmeros relatos sugerem que o resveratrol age como um potente antioxidante e induz aumento nos níveis de antioxidantes endógenos (MILLER e RICE-EVANS, 1995; ROBB et al., 2008).

Portanto, resveratrol é conhecido por possuir diversas propriedades farmacológicas, incluindo efeitos antioxidantes, anticancerígenos e cardioprotetor (SAIKO et al., 2008). Sua propriedade antioxidante é devida à sua habilidade de seqüestrar radicais superóxido ( $O_2^-$ ) e inibir atividade de enzimas oxidativas xantina oxidase (JIA et al. 2008). Nicholson et al. (2008), avaliaram a ação do resveratrol sobre a liberação de endotelina-1, um potente vasoconstritor, em resposta ao aumento de  $H_2O_2$ , e comprovou a eficiência do resveratrol na redução da expressão de endotelina-1 e consequente redução de doenças cardiovasculares. Hsia *et al.* (2011), estudaram a atividade do resveratrol no controle da contração e liberação de cálcio no útero de ratos e comprovaram o efeito inibitório do polifenol em modelos experimentais, levantando a possibilidade de uso do composto no tratamento de patologias como dismenorréia. O uso do composto natural é também avaliado em tratamento de doenças neurodegenerativas como doença de Huntington e Alzheimer. Entretanto, o estudo do resveratrol como terapia adjuvante pós-infecção na meningite bacteriana, apesar de promissor, ainda é pouco explorado.

#### **2.4 Vitamina B6: terapia adjuvante na redução de danos cerebrais**

A produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio durante a meningite bacteriana (MB) é o principal responsável pela morte de neurônios e pelas sequelas geradas durante a infecção como descrito anteriormente. Portanto, o emprego de estratégias terapêuticas seguras para reduzir o estresse oxidativo é uma importante forma de melhorar o prognóstico desta infecção. A vitamina B6 é

uma molécula hidrossolúvel requerida para a absorção e metabolismo de aminoácidos. Esta vitamina é composta de seis componentes, ou vitâmeros, piridoxina, piridoxal, piridoxamina, piridoxina-5'-fosfato, piridoxal-5'-fosfato e piridoxamina-5'-fosfato. O piridoxal-5-fosfato (PLP) é a principal forma ativa da coenzima e tem sido demonstrado em diversos estudos possuir um grande potencial antioxidante (BRIN et al., 1978; CHUMNANTANA et al., 2005).

Piridoxal 5'-fosfato é uma coenzima essencial para as enzimas quinurenina aminotransferase e quinureninase. Em um estudo de cinética *in vitro*, a vitamina B6 também mostrou que é um inibidor da quinurenina 3-hidroxilase (KYN-3-OH) (BRETON et al., 2000). Elevadas concentrações de KYN-3-OH foram encontradas em cérebros de ratos neonatais com deficiência em vitamina B6. E a administração de injeções intraperitoneal diária de vitamina B6 diminuiu a concentração de KYN-3-OH (GUILARTE e WAGNER, 1987).

A vitamina B6 tem um importante papel como coenzima na síntese de vários neurotransmissores (ERLANDER e TOBIN, 1991; ERLANDER et al., 1991; HOUSER e ESCLAPEZ, 1994). Ela também é considerado um potente antioxidante por reduzir os níveis de radicais livres circulantes durante a resposta inflamatória (CHUMNANTANA et al., 2005), sendo relacionada com a diminuição dos danos teciduais durante os processos infecciosos (CHUN-CHE e MEI-CHIN, 2009; TAYSI et al., 2005). Ainda mais, por ser hidrossolúvel a vitamina B6 é prontamente metabolizada e excretada, não sendo possível o seu armazenamento em quantidades excessivas no nosso organismo.

O nível inadequado de vitamina B6 em determinados tecidos é crítico, e o seu excesso pode gerar diferentes quadros de toxicidade (AMADIO et al., 2005), dependendo da região afetada. Concentrações insuficientes de piridoxal 5'-fosfato

no cérebro causam disfunções neurológicas, em particular epilepsia (HOFFMANN et al., 2007). Considerando que o estresse oxidativo causado durante a resposta inflamatória exerce um importante papel na indução de danos cerebrais em diversas doenças que acometem o SNC, a vitamina B6 surge como um potencial adjuvante terapêutico na redução de ERO e de danos cerebrais causados por estas moléculas reativas.

Portanto, levando em consideração as elevadas taxas de danos celulares observadas durante a MB e a associação desses danos com o estresse oxidativo gerado pela resposta inflamatória, torna-se evidente a necessidade de terapias que reduzam a exacerbada produção de moléculas oxidativas. Diante do exposto, a proteína APE1 parece ser um possível alvo na modulação da resposta inflamatória devido a sua função de oxidoredução de fatores de transcrição envolvidos na expressão de citocinas, portanto justifica-se o estudo de APE1/Ref-1 frente a a inibidores em diferentes condições de inflamação. Neste trabalho foi realizado um estudo comparativo da expressão de citocinas em pacientes com meningite causada por *S. pneumoniae* e *Neisseriae meningitides*, visando a identificação de marcadores para estudos em modelo celular. Em seguida, foi realizado um estudo de inibição de APE1/Ref-1 em cultura de células, com inibidores da atividade redox e de reparo, para avaliar o impacto desta inibição sobre os níveis de citocinas. Por fim, foi avaliada a expressão de APE1 no córtex e hipocampo de ratos com meningite pneumocócica, bem como, a ação da vitamina B6 como adjuvante terapêutico.

### **3.0 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Identificar o envolvimento de APE1/Ref-1 na resposta inflamatória visando a possibilidade de sua utilização como alvo terapêutico na redução de sequelas durante a MB.

#### **3.2 Específicos**

- Identificar e comparar os níveis de 12 moduladores inflamatórios (citocinas e quimiocinas previamente selecionadas) expressos no LCR de pacientes com meningite pneumocócica e meningocócica, e a partir dessa comparação selecionar moduladores alvos para ensaios em cultura de células estimuladas com LPS;
- Estimular células monócíticas com LPS e verificar expressão de citocinas e quimiocinas após tratamento com os inibidores da atividade redox e de reparo de APE1/Ref-1: E3330, resveratrol e metoxiamina;
- Analisar a viabilidade celular, ciclo celular, a fragmentação nuclear e o nível de marcadores de estresse oxidativo após estímulo com LPS e tratamento com E3330, resveratrol e metoxiamina;
- Determinar a expressão de APE1/Ref-1, bem como, sua localização celular em células U937 estimuladas com LPS após tratamento com inibidores de APE1/Ref-1;
- Avaliar o potencial inibitório do resveratrol sobre a atividade AP endonuclease de APE1/Ref-1;

- Quantificar em modelo experimental de ratos com meningite pneumocócica a expressão de APE1/Ref-1, bem como, do fator indutor de apoptose (AIF) no córtex (CX) e hipocampo (HC), após tratamento com vitamina B6;
- Quantificar proteínas carboniladas e glutamato em CX e HC de ratos com meningite pneumocócica com e sem adição de vitamina B6.

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Determinação do perfil de citocinas e quimiocinas em pacientes humanos.

Para a quantificação das citocinas, vinte e oito pacientes admitidos no Hospital Giselda Trigueiro (HGT) (Natal, Brasil) com MB confirmada foram arrolados neste estudo. O presente trabalho foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética médica do HGT e pelo comitê nacional de ética em pesquisa (CONEP) com o número 0052.1.051.000-05. Um termo de consentimento foi obtido de cada paciente participante deste estudo.

As amostras foram coletadas a partir da punção lombar (PL) inicial no período de admissão no hospital para fins de diagnóstico da doença. O diagnóstico foi realizado baseando-se em aspectos clínicos tais como, febre, presença de petequias, rigidez nuchal associados com o diagnóstico bioquímico e microbiológico, tais como celularidade, conteúdo de glicose, proteína e cultura bacteriana. Todas as amostras do líquido cefalorraquidiano (LCR) foram mantidas a 4°C após PL e centrifugadas a 3000 g, 5 min, 4 °C. Sobrenadantes foram congelados e armazenados a -80 °C até análises posteriores. LCR foi identificado com um código para manter o anonimato dos pacientes e o estudo foi realizado de acordo com as normas brasileiras de ética.

O diagnóstico dos pacientes foi confirmado mediante detecção do patógeno no LCR por coloração de Gram, cultura bacteriana positiva, presença de pleocitose no LCR, caracterizado pelos altos níveis de granulócitos polimorfonucleares (PMN), conforme rotina do HGT.

Os níveis de citocinas e quimiocinas foram medidos utilizando o equipamento *Bio-Plex 200 suspension array system* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) que utiliza uma metodologia de ensaios múltiplos baseado na identificação de corantes

luminescentes presentes em microesferas, bem como, na quantidade de sinal fluorescente emitido por anticorpos marcados. Para criar um perfil de expressão de citocinas e quimiocinas durante a MB, doze citocinas e quimiocinas foram investigadas no LCR de pacientes, a saber: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-10, IL-1Ra, CXCL8/IL8, proteína inflamatória de macrófago-1alfa (CCL3/MIP-1 $\alpha$ ), proteína inflamatória de macrófago-1beta (CCL4/MIP-1  $\beta$ ), proteína quimiotática de monócito-1 (CCL2/MCP-1), IL-2 e fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF). Foi usado para esta análise um kit comercial (Human cytokine Lincoplex Kit, HCYTO-60k, Lincoplex®, Linco Research Inc., St Charles, MA, USA) e aproximadamente todas as amostras foram mensuradas em duplicata e não diluídas. Todo o ensaio foi executado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, uma mistura do padrão foi reconstituída em 0.25 mL de água deionizada, gerando uma concentração estoque de 10000 pg/mL para cada citocina. O estoque padrão foi serialmente diluído no tampão de ensaio disponibilizado pelo HCYTO-60k kit gerando 6 pontos para a curva padrão. A faixa de quantidade de citocinas do ensaio vai de 3.2–10,000 pg/mL. Vinte e cinco microlitros do LCR dos pacientes foram incubados com as esferas contendo anticorpos específicos durante 16-18 h a 4 °C com agitação contínua. Cada esfera é acoplada a um anticorpo monoclonal contra uma única citocina ou quimiocina, e uma mistura de doze esferas pode detectar doze citocinas e quimiocinas por amostra. Posteriormente, as esferas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem para remover proteínas não ligadas e então incubadas com anticorpo biotilado de detecção citocina-específico por 1 h com agitação contínua. No passo subsequente, estreptoavidina–ficoeritrina foi adicionada e mantida incubada por 30 min. Após incubação, as esferas foram lavadas e ressuspensas em solução própria do sistema, e os constituintes de cada poço

foram sorvidos para *Bio-Plex Suspension Array System*, que identifica cada diferente cor das esferas como uma população de proteínas e quantifica cada proteína alvo baseado na fluorescência do anticorpo secundário. As concentrações de citocinas foram automaticamente calculadas pelo programa *Bio-Plex manager* usando a curva padrão como referência. Para verificar os níveis de citocinas liberadas pelas células, 25 µL do meio de cultura foram incubados com as esferas contendo anticorpos para as seguintes citocinas, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, CXCL8/IL8, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1  $\beta$ , CCL2/MCP-1, IL-2 e G-CSF. Em seguida, a metodologia utilizada foi semelhante a análise de citocina e quimiocinas realizada no LCR.

#### **4.2 Indução de inflamação em cultura de células.**

Neste estudo foi utilizada a linhagem celular monocítica U937 obtida a partir de um linfoma histiocítico (BCRJ-0242). As células foram subcultivadas em suspensão no meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) 44 mM (Sigma), 10% de soro bovino fetal (Gibco) e 1% de solução antibiótica e antimicótica (Sigma), em seguida, foram mantidas em estufa com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. As células foram cultivadas em frascos para cultura celular de 25, 75 e 150 cm<sup>2</sup> e os experimentos foram realizados em placas de 6, 24 e 96 poços.

Durante o procedimento de subcultivo, as células foram separadas do meio de cultura através de centrifugação (1500 rpm, 5 min), o meio de cultura foi removido dos frascos, as células foram ressuspensas e aliqüotadas em frascos novos com meio RPMI- 1640 aquecido (37 °C), e incubadas como descrito anteriormente.

Inicialmente, foram plaqueadas cerca de 3 x 10<sup>5</sup> células em placas de 24 poços, as quais foram submetidas a tratamentos com LPS (1 µg/mL) como indutor de resposta inflamatória (Song et al., 2008) e incubadas à 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>.

Após indução das células com LPS por 24 h, estas foram tratadas por 4 h com 15  $\mu$ M de resveratrol, 100  $\mu$ M de E3330 composto sintético capaz de inibir a atividade redox de APE1/Ref-1 por se ligar diretamente ao domínio redox da proteína, e 30 mM de metoxiamina, molécula com afinidade por sítios AP, formados no DNA, cuja ligação bloqueia o reconhecimento do sítio pela proteína APE1/Ref-1, impedindo a função endonuclease. A indução da inflamação foi confirmada pela análise da expressão de citocinas usando *Bio-Plex 200 suspension array system* como acima descrito. Foram escolhidos como marcadores, citocinas importantes tanto para meningite causada por pneumococo quanto meningococo. Após os tratamentos diferentes experimentos foram realizados.

#### **4.3 Modelo animal de meningite pneumocócica**

Os estudos animais foram aprovados pelo comitê de cuidado animal e experimentação de Berna, Suíça, e seguiu as orientações do Instituto Nacional de Saúde para os experimentos que utilizaram animais. Ratos wistar (n=29) foram infectados intracisternalmente no 11º dia de vida com 10  $\mu$ l de salina contendo *S. pneumoniae* ( $\log_{10}$  6.4  $\pm$  0.7 cfu/mL), com uma agulha de 32-gauge (Leib et al., 1998, 2000). Os animais foram randomizados para o tratamento com vitamina B6 (600 mg/kg 0 h pós infecção, n=19) ou igual volume (360  $\mu$ l) de salina (n=10). Nos animais controle não-infectados (n=10) foram injetados 10  $\mu$ l de solução salina estéril. LCR foi obtido por punção na cisterna magna e 5  $\mu$ l foi submetido a cultura para confirmar a meningite bacteriana (LEIB et al., 1998). Todos os animais receberam a terapia antibiótica (Ceftriaxone, 100 mg/kg subcutaneamente; Roche Pharma, Reinach, Suíça). Animais foram eutanaziados em tempos predeterminado, 20 h (n=14) e 24 h (n=15) pós infecção (p.i.), através de uma dose de pentobarbital administrada intraperitonealmente (100 mg/kg). Estes tempos têm sido associados a

altos índices de apoptose durante MP. Animais controles foram eutanaziados nos mesmos tempos que os indivíduos infectados (n=5 para cada tempo). Após perfusão com PBS gelado, os cérebros foram cortados em dois hemisférios. A partir de ambos os hemisférios, córtex (CX) e hipocampo (HC) foram isolados. A metade direita dos cérebros foi congelada imediatamente em gelo seco e armazenado no  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para extração de proteína, enquanto a metade esquerda foi guardada numa solução de proteção e estabilização de RNA (RNA later, Life Technologies, USA) para posterior extração de RNA.

#### **4.4 Extração de RNA e PCR em tempo real**

A partir de células U937 tratadas como previamente descrito, o RNA total foi extraído usando o kit illustra tripleprep (GE healthcare, Sweden). A avaliação da integridade do RNA e a sua quantificação foram feitas usando o *Bioanalyzer* da plataforma Agilent 2100 (RNA 6000 Nano, Agilent technologies, Waldbronn, Germany) e *nanovue* (GE healthcare, Sweden), respectivamente. A integridade do RNA é verificada utilizando um princípio semelhante a eletroforese em gel de agarose, no entanto no bioanalyzer a corrida é feita em um capilar contendo um polímero em que a molécula é identificada por um corante fluorescente. Ao final são gerados eletroferogramas que indicarão a integridade do RNA. A quantificação de RNA é baseada na leitura espectrofotométrica da molécula no comprimento de onda de 260 nm. A síntese de cDNA foi realizada com *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster, CA). Para os tecidos de córtex e hipocampo do ratos com MP, o RNA total foi extraído usando RNeasy® Lipid Tissue kit (QIAGEN, Basel, Suíça) e purificados com RNeasy columns (QIAGEN, Basel, Suíça). Semelhante ao realizado com o RNA extraído das células, a avaliação da integridade e a quantificação do RNA foram realizadas na plataforma Agilent 2100

(RNA 6000 Nano, Agilent technologies, Waldbronn, Alemanha) e no NanoDrop® (NanoDrop, Wilmington, USA), respectivamente. Para síntese do cDNA foi usado o kit *OmniScript First Strand cDNA Synthesis* (Qiagen). Para isto, foram utilizados 2 µg do RNA total e primers oligo-dT (Promega, Madison, WI), seguindo as instruções do fabricante.

A reação de amplificação dos cDNA oriundo das células e do CX e HC foi realizada com *SYBR-green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster, CA) e a amplificação do cDNA ocorreu no equipamento Step One (Applied Biosystems, Foster, CA). A especificidade do sinal do *SYBR-green* foi validada pela presença de um único pico bem definido observado na curva de *melting* para cada corrida de PCR. A quantidade de cDNA foi mensurada utilizando o método  $\Delta C_t$  tendo a expressão constitutiva do gene do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como gene de referência. Outros genes constitutivos foram testados, porém GAPDH apresentou o melhor resultado e, portanto, foi o mais indicado para os ensaios.

Os oligonucleotídeos das citocinas e do GAPDH das células foram obtidos de um banco de dados público (<http://www.rtprimerdb.org/>), como mostrado adiante: TNF- $\alpha$  (RTPrimerDB ID: 996), IL-8 (RTPrimerDB ID: 991), MCP-1 (RTPrimerDB ID: 3533) e GAPDH (RTPrimerDB ID: 3). Enquanto que os oligonucleotídeos para APE1/Ref-1 foram obtidos usando o programa Primer 3, em que foram selecionados os primers *forward*, TCTCGCGAGTAGGGCAACGC, e o *reverse*, TCTTCCGCCACCGCTCCCTT. Assim como nas células, os primers para APE1/Ref-1 dos ratos foram desenhados usando o programa Primer 3, em que foram selecionados as seguintes sequências *forward*, TGCTCCAGACGCCTAAGGGCTTT, e *reverse*, TCTGGCTCGGACTTGGGTTCTTCC, enquanto que para o fator indutor de

apoptose (AIF) e GAPDH, os oligonucleotídeos foram (RTPrimerDB ID: 3945) e (RTPrimerDB ID: 192), respectivamente.

#### **4.5 Extração de proteínas totais e Western blot**

Durante o procedimento de extração de RNA das células com o kit triple prep (GE healthcare, Sweden) como descrito anteriormente foi realizada também a extração de proteínas totais de acordo com as instruções do fabricante. Enquanto que para a obtenção do extrato total de proteínas dos ratos, as amostras de córtex e hipocampo congeladas foram homogeneizadas em tampão de extração gelado (50 mM Tris, 2 mM MgCl<sub>2</sub> at pH 8.0, 0.4 mM PMSF, 0.4 mM NaCl, 1% NP-40) com o *TissueRuptor*, um tipo de homogeneizador elétrico (Qiagen, Basel, CH). Nesta extração foi levada em consideração a relação peso da amostra e volume do tampão de extração, em que para o CX foi considerado a proporção 1:5 (p/v) enquanto para o HC a proporção 1:3 (p/v). Os homogenados foram centrifugados (10,000 × g, 15 min, 4 °C), o sobrenadante transferido, aliquoteado e congelados em gelo seco. A concentração das proteínas, oriundas das células U937 e dos tecidos do CX e HC, foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bradford, 1976). Para as proteínas observadas neste estudo, cerca de 10 µg de proteínas totais foram separadas em SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de PVDF. Por sua vez, a membrana foi bloqueada em solução bloqueadora (5% de leite desnatado em solução salina de TBS contendo 0,1% de Tween - TBST), e posteriormente incubada com anticorpos primários, monoclonal anti-APE1 (1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), monoclonal anti-AIF (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), monoclonal beta-actina (1:5000, Sigma-alderich, USA), monoclonal anti-TRX (1:1000, Abcam, Cambridge, USA) por aproximadamente 16 - 18 h. Em seguida, três lavagens de 10 min foram realizadas e um anticorpo secundário monoclonal,

específico para a cadeia pesada do IgG de camundongo, ligado a uma peroxidase foi utilizado (1:1000, RD systems, Minneapolis, MN, USA) para a detecção das proteínas especificadas. Para revelação dos filmes contendo a marcação das proteínas, as membranas foram submetidas a uma reação de quimioluminescência dependente da ativação da peroxidase presente no anticorpo secundário. Em seguida, as bandas protéicas foram quantificadas por densitometria usando o programa ImageJ.

#### **4.6 Imunofluorescência**

A localização celular de APE1/Ref-1 foi realizada a partir de ensaios de imunofluorescência. Para tanto,  $3 \times 10^5$  células foram tratadas com LPS e inibidores de APE1/Ref-1, como descrito anteriormente, e fixadas durante 60 min em lamínulas previamente expostas a poli-L-lisina, por 30 min. Após o tratamento, as células foram lavadas com uma solução salina (PBSA) gelada e fixadas com paraformaldeído 3% (PFA 3%) durante 30 min, à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS + Triton X-100 0,5%, durante 15 min, de forma a manter somente as proteínas ligadas à cromatina. Após esse procedimento, a solução de PBS + Triton X-100 0,5% foi removida e as células foram lavadas três vezes com PBS + tween-20 0,1%, durante 5 min, sob agitação leve. As células foram incubadas com anticorpo primário anti-APE1, por 1 h, e foram lavadas três vezes com PBS + tween-20 0,1%, por 10 min, sob agitação leve. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), no escuro durante 1 h. Decorrido tempo, foram realizadas três lavagens com PBS + tween-20 0,1%, por 10 min. Terminado o processo de lavagem, as lâminas foram montadas utilizando-se a solução de montagem (Dako) + DAPI 1,5 µg/ml, e analisadas em microscópio de fluorescência CKX41 (Olympus),

utilizando-se a câmera para fluorescência DP-70 (Olympus). Todos os anticorpos foram diluídos em PBS + tween-20 0,1% + BSA 2%.

#### **4.7 Ensaio de viabilidade celular**

As células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) por 24 h e em seguida foi adicionado os inibidores de APE1/Ref-1 por um período de incubação de 24 h. A concentração dos inibidores foi similar a indicada no item 4.2.. Após o período de incubação, as células foram coradas com o azul de Tripán em uma proporção de 1:1 (v:v). A contagem das células totais (vivas e mortas) foi realizada em câmara de Neubauer e a viabilidade das células foi determinada usando o método de exclusão do Azul de Tripán, em que as células coradas com azul de Tripán foram consideradas mortas. Para efeito de cálculo da viabilidade, foi realizada a razão entre a quantidade de células vivas pela quantidade de células total multiplicado por 100 [(células vivas/células total)\*100].

#### **4.8 Avaliação do ciclo celular por FACS e apoptose com Hoescht 33258**

Cerca de  $3 \times 10^5$  células U937 após exposição aos inibidores de APE1/Ref-1 como descrito previamente foram centrifugadas e o precipitado celular fixado em etanol 70% (preparado em PBS) por no mínimo 12 h a 4 °C. Após o período de fixação as células foram ressuspensas em PBS contendo iodeto de propídio (2 µg/mL) e RNase A livre de DNase (10 µg/mL). Após incubação a 37 °C por 1 h, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (BD, Becton Dickinson) em comprimento de onda de 488 nm. A fluorescência vermelha do DNA foi coletada a partir de 10.000 células por amostras. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram analisados usando o programa *Flow Jo7.6.5*.

#### **4.9 Avaliação da apoptose com Hoechst 33258**

A condensação da cromatina é normalmente um dos últimos eventos da apoptose e pode ser detectado pela fixação nuclear com Hoechst 33258. Portanto, para esta análise as células após os tratamentos com os inibidores foram centrifugadas e fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min em temperatura ambiente, posteriormente foram lavadas duas vezes com PBS. Posteriormente as células foram permeabilizadas com 0.5% de Triton X-100 e deixadas por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com Hoechst 1 µg/mL por 30 min a 37 °C. Depois, as lâminas foram montadas e observadas em microscopia de fluorescência usando os comprimentos de onda 350 nm para excitação e 460 nm para emissão. Cerca de 500 células por tratamento foram observadas.

#### **4.10 Ensaio para quantificação de ERO e 8-oxoG**

Para quantificar a produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, foi utilizado o teste de fluorescência usando diclorofluoroceína-diacetato (DCFH-DA). As células foram distribuídas em placas de 96 poços, previamente tratada com poli-L-lisina. Na concentração de  $10^4$  células por poço em 100 µL de meio de cultura, as células foram expostas ao LPS por 24 h e os respectivos inibidores por mais 4 h, em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Decorrido o tempo dos tratamentos, o meio de cultura foi aspirado e 200 µL de DCFH-DA (100 µM) foram adicionados aos poços por 30 min. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e, posteriormente, adicionados 200 µl de meio RPMI sem fenol red, e realizada a leitura em leitor de microplacas sigma D-6883, sob excitação de 485 nm e emissão de 530nm. Quanto a quantificação de 8-oxoG, as células foram tratadas igualmente ao ensaio descrito anteriormente, e em seguida o meio foi retirado e adicionado 200 µL de etanol

absoluto à -20 °C por 20 minutos para fixação das células. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com 200µL de 0,1% Triton X-100 em PBS mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos. Duas lavagens com PBS foi realizada e um bloqueio com 200 µL de 10% soro fetal bovino/PBS por 1 hora em temperatura ambiente. Para finalizar, no escuro foi adicionado 1:200 de FITC:avidina em um volume de 200 µL por poço e incubado por 1 h à 37 °C. Após 4 lavagens com 10% soro fetal bovino/PBS a placa foi levada ao leitor de placas para detecção a 485 nm de excitação e 530 nm de emissão.

#### **4.11 Ensaios de clivagem de sítios AP**

Para avaliar o efeito inibitório de resveratrol sobre a atividade de reparo da proteína APE1/Ref-1, plasmídeos depurinados foram utilizados como fonte de sítios AP. Neste ensaio plasmídeos pBC circular e covalentemente fechados (Forma I), obtido através de uma minipreparação plasmidial de segundo protocolo de Sambrook e Russell (2001), foram parcialmente depurinados em uma solução tampão (20 mM NaOAc, 100 mM NaCl) por 20 min a 70 °C (IZUMI et al., 1992). Em seguida os plasmídeos depurinados foram incubados com resveratrol e com a proteína APE1/Ref-1 (New England Biolabs). O produto da reação foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 0.8% e após detecção com *SYBR green* foram visualizados em luz UV. Os níveis de clivagem observados a partir da forma I e forma II (FII) do plasmídeo foram analisados em gel de agarose e quantificados por densitometria com o programa Image J 1.41. Os dados da densitometria foram aplicados na seguinte fórmula  $-\ln (1.4 \times FI / (1.4 \times FI + FII))$ .

#### **4.12 Determinação do Glutamato**

O glutamato foi determinado usando o *glutamate assay kit* (BioVision, CA, USA). O extrato protéico total de ambos tecidos foi homogeneizado com o tampão

de ensaio fornecido e em seguida misturado ao *glutamate developer* e *enzyme mix*, também fornecidos pelo kit. Após isto, a reação total foi incubada por 30 min a 37 °C e protegida da luz. Por fim, as amostras foram quantificadas em um leitor de microplacas a 450 nm (MicroQuant, Biotek).

#### **4.13 Conteúdo de proteínas carboniladas**

O conteúdo de carbonilação foi determinado espectrofotometricamente usando o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) como descrito (Hawkins et al., 2009). As proteínas derivadas de hidrazona foram sequencialmente extraídas com 10% (p/v) de ácido tricloroacético, tratado com acetato de etila/etanol 1:1(v/v), e re-extraído com 10% ácido tricloroacético. O precipitado resultante foi dissolvido em 6 M hidrocloreto de guanidina e quantificado a 370 nm no leitor de microplacas (MicroQuant, Biotek). A diferença da densidade óptica obtida das amostras tratadas com DNPH em HCl *versus* as amostras tratadas somente com HCl foi determinada. Resultados são expressos em nmol de DNPH incorporado por mg de proteína.

#### **4.14 Análises estatísticas**

Os dados foram analisados usando o programa Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Para verificar se os resultados observados seguiam uma distribuição normal, teste de normalidade, Kolmogorov-Smirnov, foi aplicado aos dados. As variáveis que não seguiram distribuição normal foram analisadas com métodos não-paramétricos e diferenças entre grupos foram analisados usando o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. Comparações múltiplas com o teste de Tukey foram realizadas quando a distribuição era normal. Diferenças entre dois grupos foram analisados com o *unpaired t test* quando a distribuição era normal e *Mann Whitney* quando a distribuição não era normal. Os dados estão expressos como média e erro padrão quando a distribuição foi normal, ou mediana e (25; 75

percentuais) quando a distribuição não foi normal. Para todos os testes estatísticos, valores obtidos com o  $P < 0.05$  foram considerados significativos.

## 5.0 Resultados

### 5.1 Perfil de citocinas em pacientes com meningite bacteriana

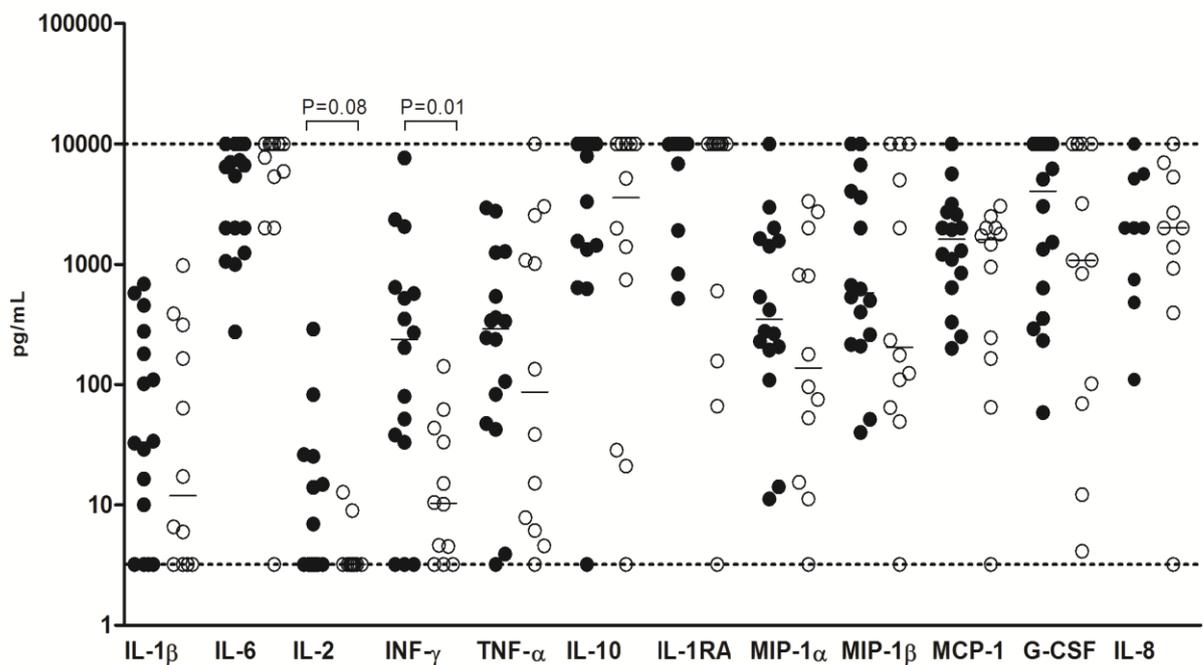
Considerando os pacientes atendidos no HGT que foram incluídos neste estudo, *S. pneumoniae* foi diagnosticado em dezesseis deles e *N. meningitidis* em doze. A maioria desses pacientes é estão na faixa etária adulta, embora seis crianças encontram-se no grupo com meningite pneumocócica (MP) e quatro no grupo com meningite meningocócica (MM). Os parâmetros bioquímicos do LCR dos pacientes de acordo com cada agente causador, incluindo o número de leucócitos, proteína, conteúdo de glicose estão detalhados na Tabela 01. O número de células no LCR dos pacientes com MM foi significativamente mais elevado do que os pacientes com MP, embora os outros parâmetros não mostrem diferenças estatísticas.

A comparação das concentrações de cito/quimiocinas nas amostras de LCR está apresentada na Figura 8. Diferenças significativas nos níveis de cito/quimiocinas do LCR entre *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* não foram observadas, com exceção para  $IFN\gamma$ . Níveis significativamente elevados de  $IFN\gamma$  nos pacientes com MP (mediana 237,2 pg/mL, percentual 34,5-624,7 pg/mL;  $P<0.05$ ) comparados a MM (mediana 10,33 pg/mL, faixa 3,5-41,1 pg/mL) foram observados. Apesar de não mostrar significância estatística, foi observado elevados níveis de IL-2 no LCR de pacientes com MP.

| LCR (n° amostras)           | Idade <sup>a</sup><br>(anos) | Celularidade <sup>a</sup><br>(cel/mm <sup>3</sup> ) | Proteína <sup>b</sup><br>(g/L) | Glicose <sup>a</sup><br>(mg/dL) |
|-----------------------------|------------------------------|---|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>S. pneumoniae</i> (16)   | 30 (5; 53)                   | 733 (396; 2,520)                                    | 211.6 ± 51.45                  | 17.5 (5; 57)                    |
| <i>N. meningitidis</i> (12) | 23 (7; 27)                   | 3.360 (929; 12,925) <sup>c</sup>                    | 150.4 ± 29.8                   | 44.5 (5; 60)                    |

**Tabela 1.** Parâmetros biológicos dos grupos etiológicos de acordo com o diagnóstico do LCR.

<sup>a</sup> Valores estão representados como mediana (25; 75 percentis); <sup>b</sup> Valores estão representados como média ± SE; <sup>c</sup> Valor significativo comparado a *S. pneumoniae* ( $P \leq 0.05$ ).



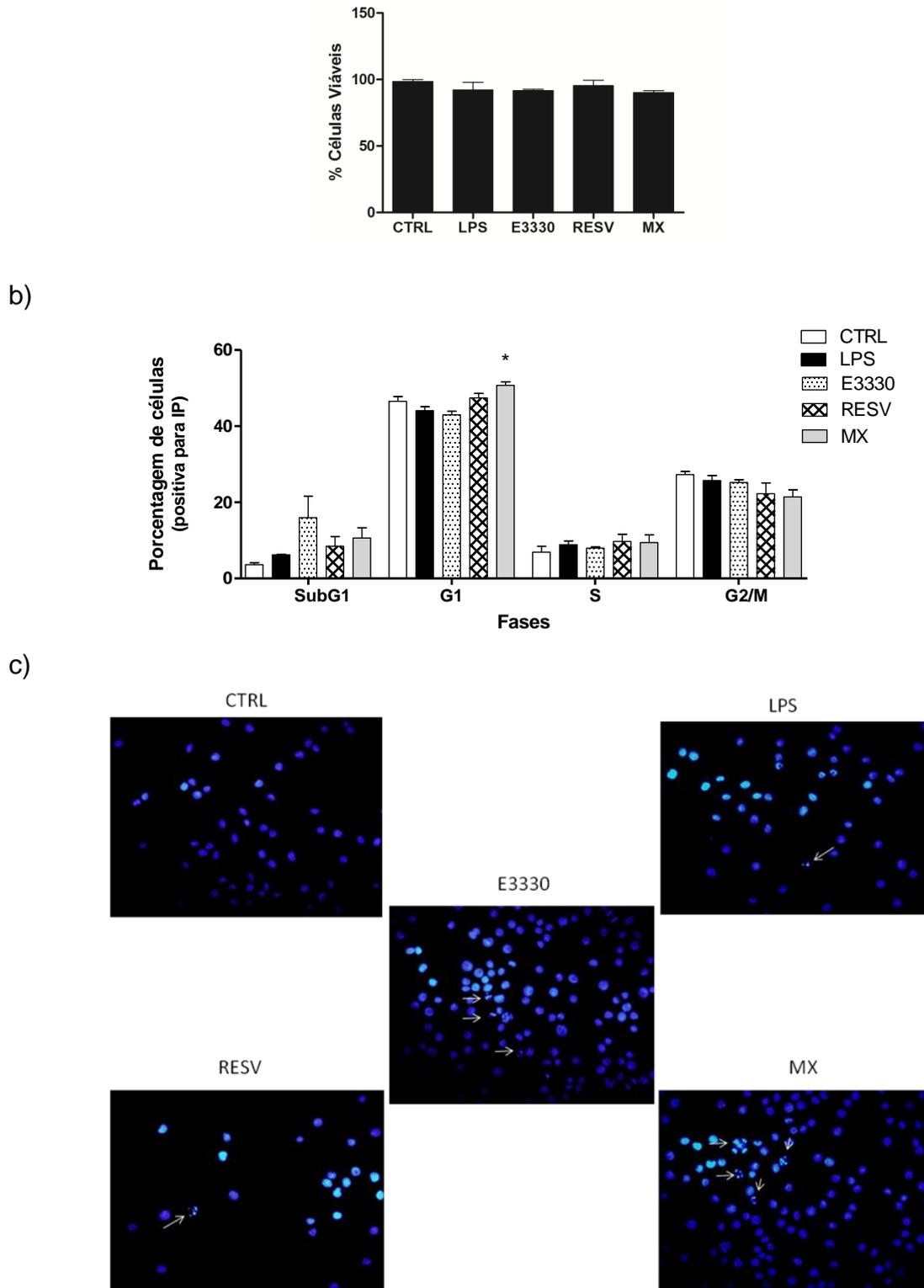
**Figura 8.** Comparação dos níveis de cito/quimiocinas no LCR de pacientes com *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*. Pacientes com MP estão representados com bolas pretas (●) e pacientes com MM estão representados com bolas brancas (○).

## **5.2. Os inibidores de APE1/Ref-1 não afetam a viabilidade e o ciclo celular e não promovem significativa fragmentação nuclear**

O efeito dos inibidores de APE1/Ref-1 sobre a viabilidade das células U937 foi testado e avaliado pela contagem de células viáveis por exclusão com *tripan blue*. As células U937 expostas apenas ao indutor LPS foram comparadas às células tratadas com LPS seguido da adição de resveratrol, E3330 e metoxiamina. Os resultados demonstraram que as concentrações dos compostos utilizados não alteraram significativamente a viabilidade celular (Figura 9a). As células apresentaram viabilidade média em cerca de 90% frente aos compostos avaliados. As células não tratadas foram usadas como controle negativo.

Os resultados observados nas células estimuladas com LPS após tratamento com os inibidores de APE1/Ref-1 mostraram que não houve significativo efeito sobre o ciclo da celular. MX, o inibidor de reparo de APE1/Ref-1, foi o único agente que mostrou um aumento significativo de células paradas na fase G1 em relação às células somente tratadas com LPS, levando a uma moderada redução na frequência de células na fase G2/M. Por outro lado, nenhuma mudança significativa nas outras fases do ciclo celular foi observada (Figura 9b). Após a análise de eventos tais como, condensação da cromatina e fragmentação nuclear, com Hoechst 33258 observou-se que cerca de 5-12% das células tratadas com os inibidores de APE1/Ref-1 apresentaram fragmentação nuclear, sendo a maior quantidade de observada depois do tratamento com MX (Figura 9c).

a)



**Figura 9.** Análise da viabilidade, ciclo celular e fragmentação nuclear das células U937 após indução de resposta inflamatória por LPS e tratamentos com inibidores de APE1/Ref-1. O gráfico (a) representa o percentual de células viáveis pelo ensaio de *Tripan blue*, enquanto que (b) mostra o percentual de células em cada fase do

ciclo celular observado pelo FACS e (c) mostra a fragmentação nuclear com Hoechst 33258. Em (b), MX promoveu a parada das células em G1 comparado com LPS, \* valor de  $P < 0.05$ . Em (c), as setas indicam a presença de fragmentos nucleares. Os resultados são a média de três experimentos independentes. RESV= Resveratrol; MX= Metoxiamina

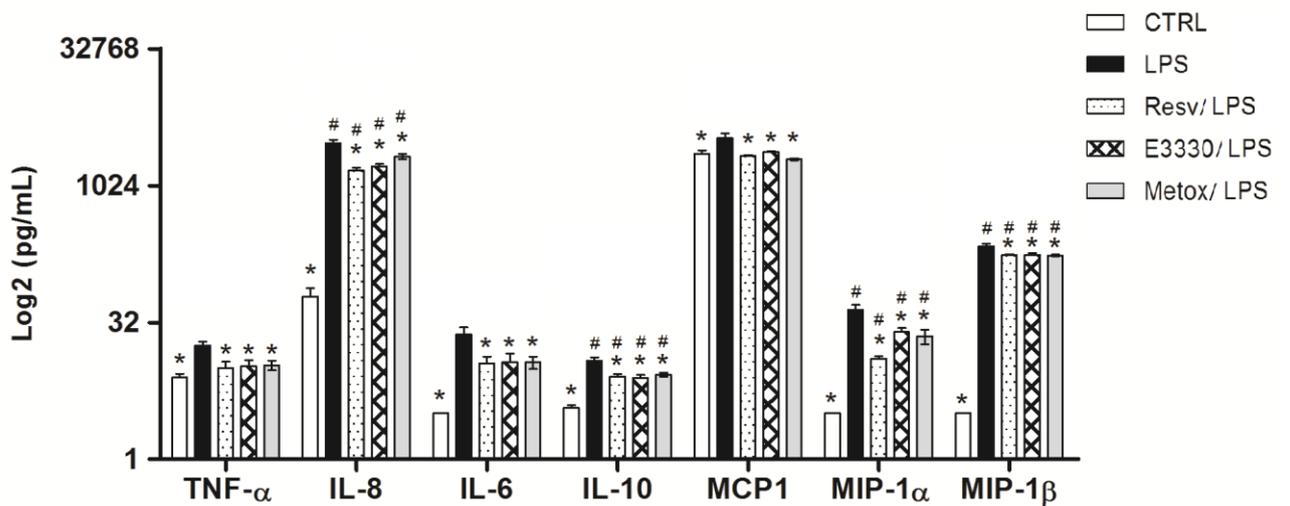
### **5.3 Células estimuladas com LPS têm redução de expressão de citocinas após tratamento com E3330, resveratrol e metoxiamina**

Os níveis de citocinas foram medidos em meio de cultura de células U937 após 24 h de tratamento com LPS seguido da adição de E3330, resveratrol e MX por 4 h. Após 24 h de indução com LPS foi observado um aumento expressivo das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  como mostrado na Figura 10a. Neste estudo, a indução com LPS não promoveu aumento na expressão de IL-1 $\beta$ , IL-2 e G-CSF. A adição de E3330, resveratrol e MX por 4 h causou uma diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ . As concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-6 e MCP-1 reduziram-se aproximadamente ao mesmo nível das células não estimuladas com LPS.

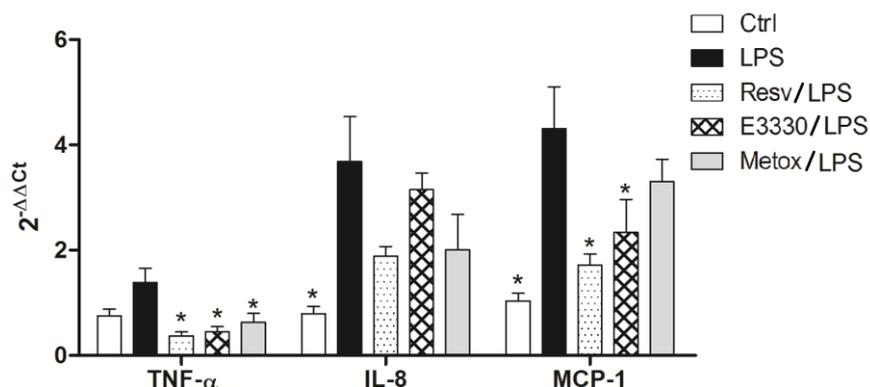
Quanto a comparação dos inibidores de APE1/Ref-1, não houve diferença significativa em relação ao nível de citocinas entre um inibidor do domínio redox, por exemplo E3330, e MX, um inibidor do reparo de DNA. Embora, resveratrol, tenha mostrado um forte efeito na redução de citocinas em relação aos outros inibidores (Figura 10a). Para verificar se há também efeito dos inibidores de APE1/Ref-1 em níveis transcricionais, foram quantificados os transcritos dos genes *TNF- $\alpha$* , *IL-8* e *MCP-1* (Figura 10b). Elevados níveis de RNAm foram observados em células estimuladas com LPS, e após os tratamentos a diminuição foi observada nos três genes escolhidos. TNF- $\alpha$  demonstrou significativa redução após os três tratamentos.

Por outro lado, IL-8, apesar de mostrar redução após os tratamentos, não foi significativa. A quimiocina MCP-1 teve níveis reduzido de RNAm após tratamento com resveratrol e E3330, mas não após MX. Interessantemente, ambas citocinas, TNF- $\alpha$  e MCP-1, que demonstraram maior redução nos transcritos, também mostraram forte redução nos níveis proteicos. Os resultados dos níveis de RNAm também demonstraram que resveratrol possui um potente efeito sobre a inibição de citocinas (Figura 10b).

a)



b)

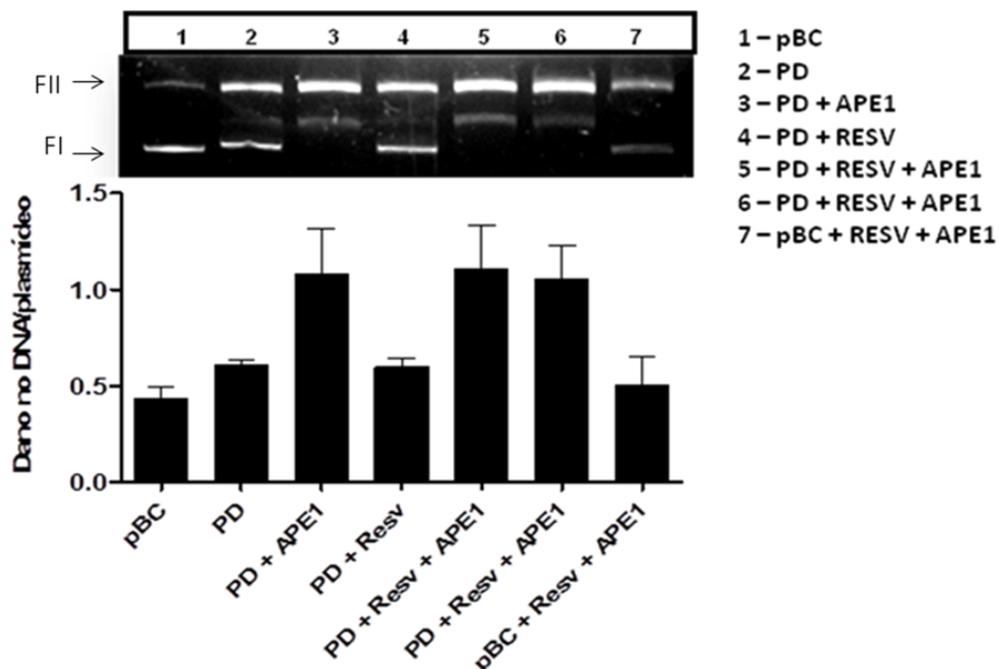


**Figura 10.** Expressão de citocinas e quimiocinas por células U937, após a indução de resposta inflamatória com 1  $\mu$ g/mL de LPS durante 24 h e seguido de 4 h de tratamento com inibidores de APE1/Ref-1 (100  $\mu$ M de E3330, 15  $\mu$ M de Resveratrol

e 30 mM de Metoxiamina) avaliados através do nível proteico (a) e de RNA mensageiro (b). \*  $P < 0.05$  em relação ao tratamento com LPS; #  $P < 0.05$  em relação ao controle não tratado

#### 5.4 Resveratrol não inibe a atividade de reparo de DNA de APE1/Ref-1

Uma vez que resveratrol demonstrou forte inibição sobre a expressão de citocinas, foi investigado se resveratrol também poderia inibir a atividade de reparo de DNA da APE1/Ref-1. Plasmídeos depurinados contendo sítios abásicos foram incubados com APE1/Ref-1 comercial na presença ou ausência de resveratrol. Nossos resultados demonstraram claramente que resveratrol na concentração estudada não inibiu diretamente a atividade de reparo de APE1/Ref-1 visto que a clivagem do substrato foi observada (Figura 11).



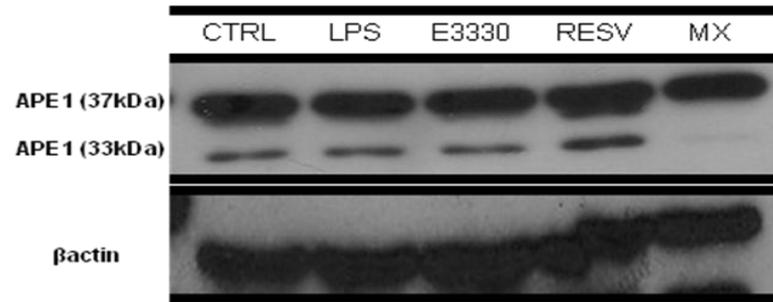
**Figura 11.** Análise da capacidade de clivagem de DNA plasmidial por APE1/Ref-1 após tratamento com resveratrol. Os números 5 e 6 possuem os mesmos itens, mas foram colocados de forma diferente. (A) Gel de agarose com perfil de clivagem; (B)

Quantificação do ensaio de clivagem por densitometria. O cálculo foi realizado utilizando a fórmula  $[x = -\ln(1.4 \times FI / (1.4 \times FI + FII))]$  e o gráfico corresponde ao resultado de dois ensaios independentes. pBC- plasmídeo; PD = plasmídeo depurinado; Resv = resveratrol; FI= forma plasmidial I; FII= forma plasmidial II.

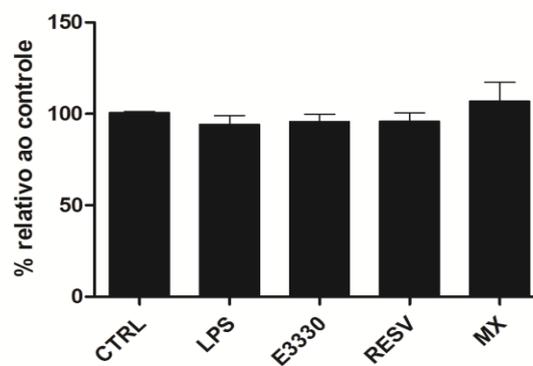
### **5.5 Expressão dos níveis de APE1/Ref-1 após adição de inibidores**

Para verificar se os tratamentos afetam a expressão de APE1/Ref-1, proteínas totais das células foram extraídas e western blot realizado para verificar a expressão protéica de APE1/Ref-1. Duas formas de APE1/Ref-1 foram identificadas, a forma completa com 37 kDa, e uma forma menor de aproximadamente 33 kDa. Como observado, LPS não alterou os níveis de APE1/Ref-1 comparado com o grupo controle. E apesar dos tratamentos, a APE1/Ref-1 com 37 kDa permaneceu com o mesmo nível de expressão entre os grupos (Figura 12a e 12b). Entretanto, células tratadas com MX não apresentaram APE1/Ref-1 com 33 kDa (Figura 12a). Logo em seguida, experimentos para verificar os níveis de RNAm de APE1/Ref-1 foram realizados. Nossos resultados demonstraram um efeito inibitório dos tratamentos sobre os níveis transcricionais de APE1/Ref-1 (Figura 12c). Similar ao que foi verificado nos níveis de citocinas, o composto resveratrol mostrou maior inibição sobre os níveis de APE1/Ref-1, seguido por MX e E3330. Apesar dos tratamentos não afetarem os níveis proteicos de APE1/Ref-1, efeitos sobre modificações pós-traducionais e nos níveis de mRNA foram observados.

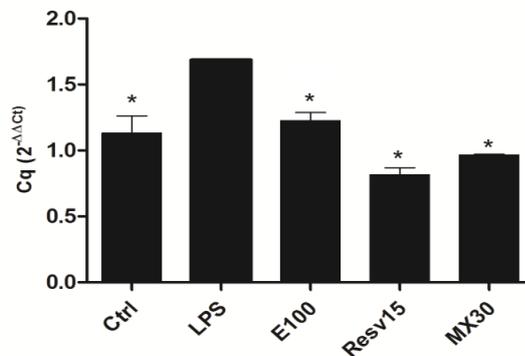
a)



b)



c)



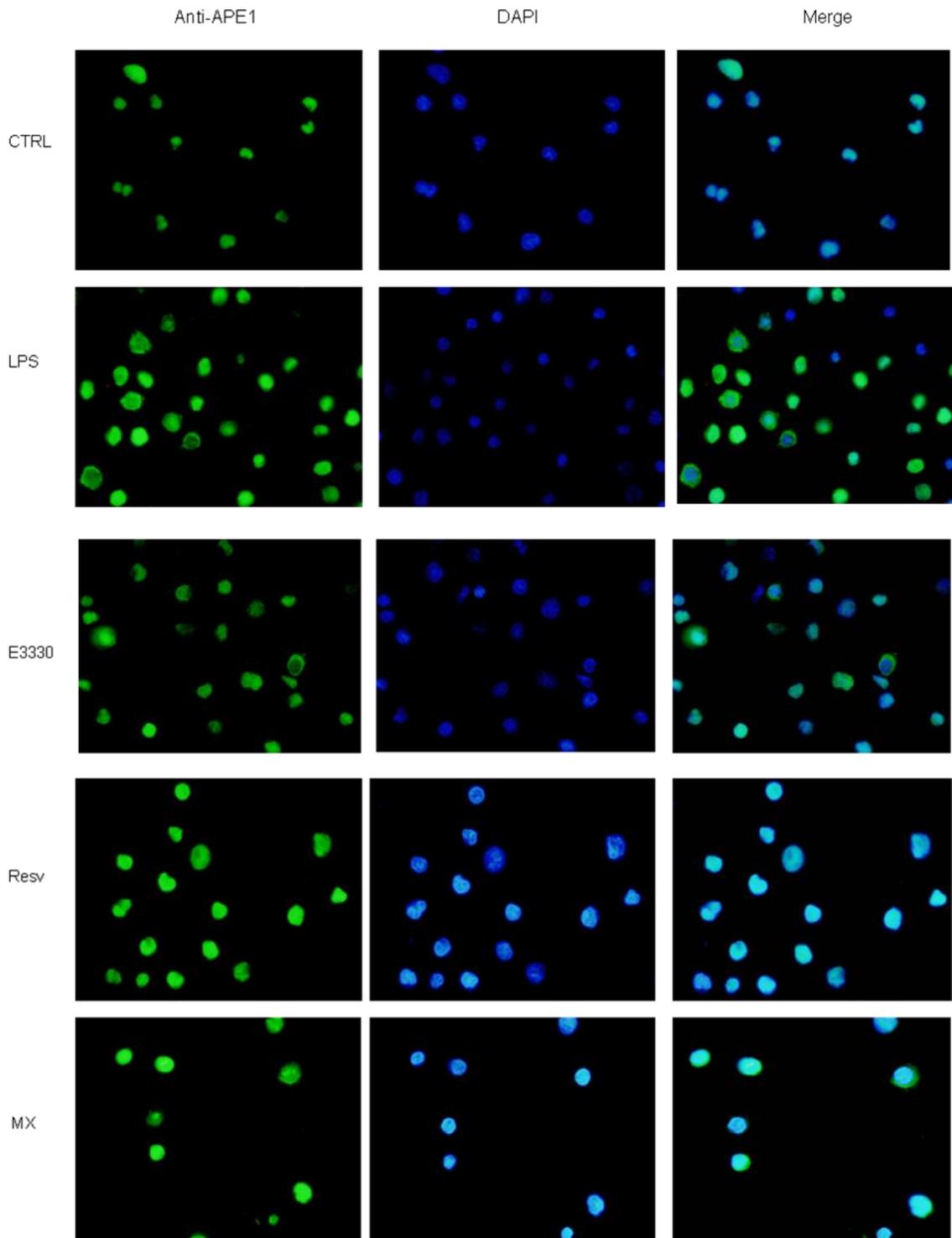
**Figura 12.** Perfil de expressão de APE1/Ref-1 após a indução de resposta inflamatória com 1 µg/mL de LPS durante 24 h e em seguida de 4 h de tratamento com inibidores de APE1/Ref-1 (100µM de E3330, 15 µM de Resveratrol e 30mM de Metoxiamina). Os dados da quantidade de proteína foram comparados com os valores de β-actina (a e b) e os dados de RNA mensageiro comparados com GAPDH (c). Apesar de em (a) ser mostrado somente um gel, o gráfico mostrado em

(b) reflete a média de dois experimentos. Os valores foram analisados usando programa Graphpad 5.0. \*  $P < 0.05$  em relação ao tratamento com LPS.

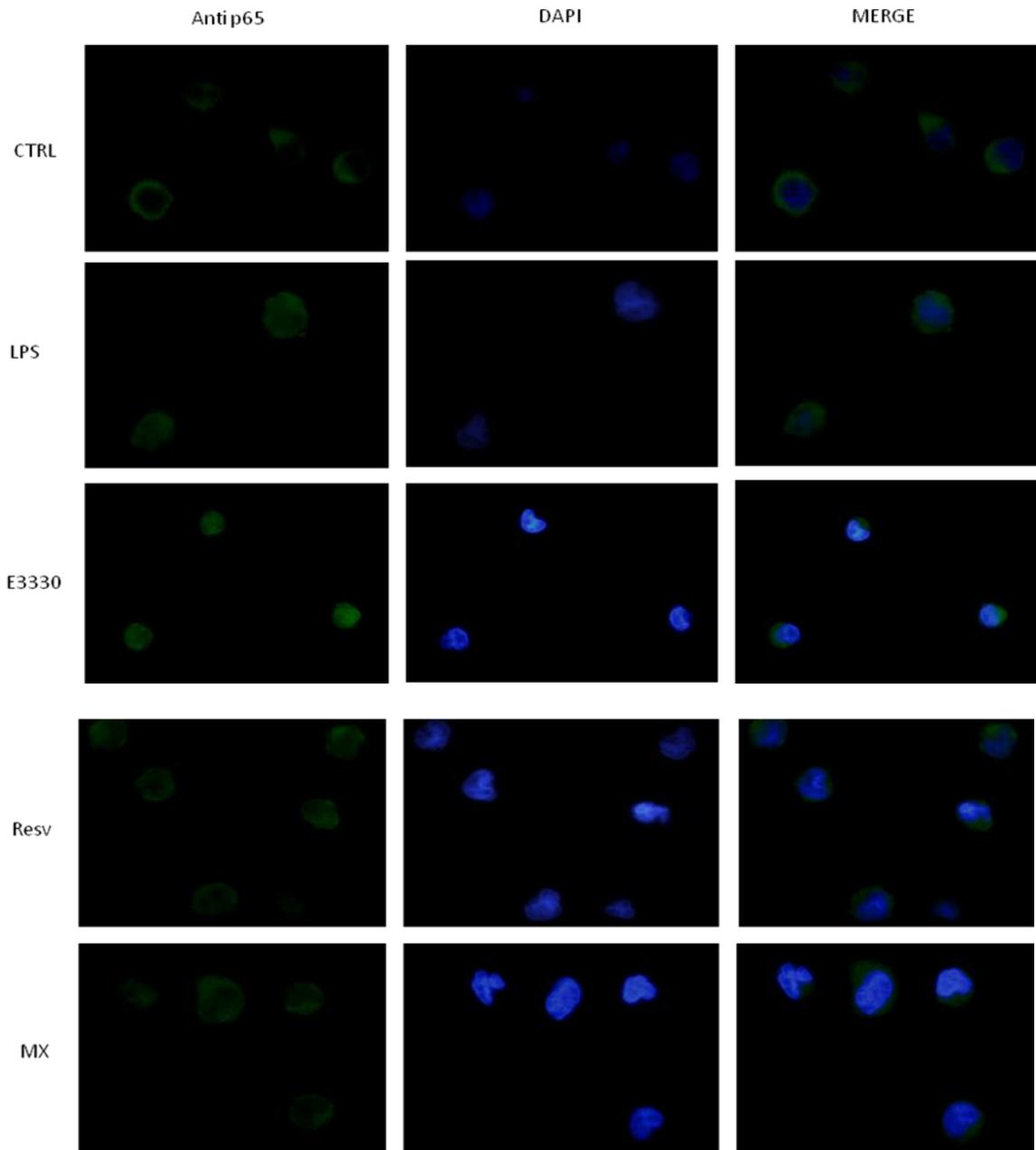
### **5.6 Localização celular de APE1/Ref-1 e p65 após adição de inibidores de APE1/Ref-1**

Embora as quantidades protéicas de APE1/Ref-1 não tenham sido alteradas pós adição dos inibidores, o efeito destes sobre a expressão de citocinas foi notório. Além disso, sabe-se que APE1/Ref-1 exerce um importante papel redox sobre fatores de transcrição como NF $\kappa$ B, proteína fundamental para a expressão de citocinas. Portanto, foram realizados experimentos de localização celular de APE1/Ref-1 e p65 (subunidade de NF $\kappa$ B) para avaliar o efeito dos inibidores de APE1/Ref-1 sobre a localização celular destas proteínas. A linhagem celular estudada U937 sem qualquer tratamento mostra a proteína APE1/Ref-1 localizada principalmente no núcleo, enquanto que a subunidade p65 de NF $\kappa$ B encontra-se localizada principalmente no citoplasma (Figura 13a e 13b). Após 24 h de estímulo com LPS, foi observado um aumento marcante de APE1/Ref-1 no citoplasma, enquanto a subunidade p65 teve um aumento marcante no núcleo. Após a adição de E3330, MX e resveratrol APE1/Ref-1 reduziu sua localização citoplasmática translocando-se para o núcleo. Por outro lado, p65 pouco alterou sua localização espacial na célula após a adição dos inibidores de APE1/Ref-1, permanecendo principalmente no núcleo.

a)



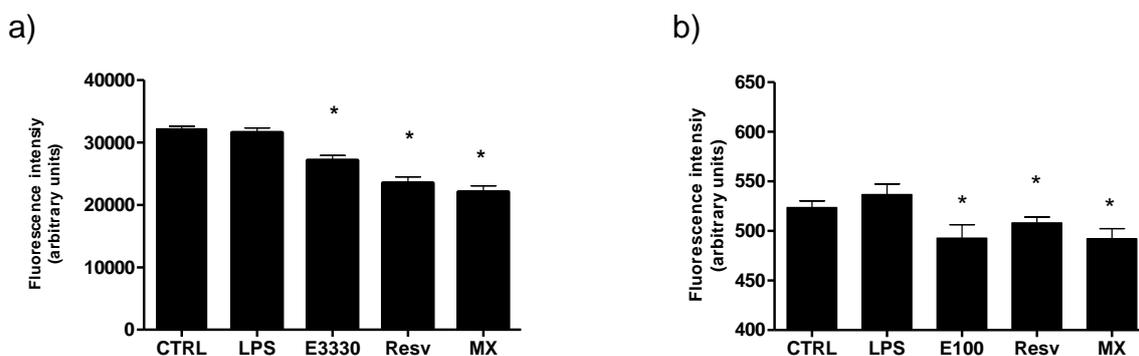
b)



**Figura 13.** Imunofluorescência para APE1/Ref-1 (a) e a subunidade p65 de NFkB (b). Nas imagens mostradas em (a), APE1/Ref-1 está marcada de verde e o DNA celular de azul. Da mesma forma em (b), p65 está marcada de verde e o DNA celular em azul.

## 5.7 Inibidores de APE1/Ref-1 diminuem o conteúdo celular de ERO e de 8-oxo-G

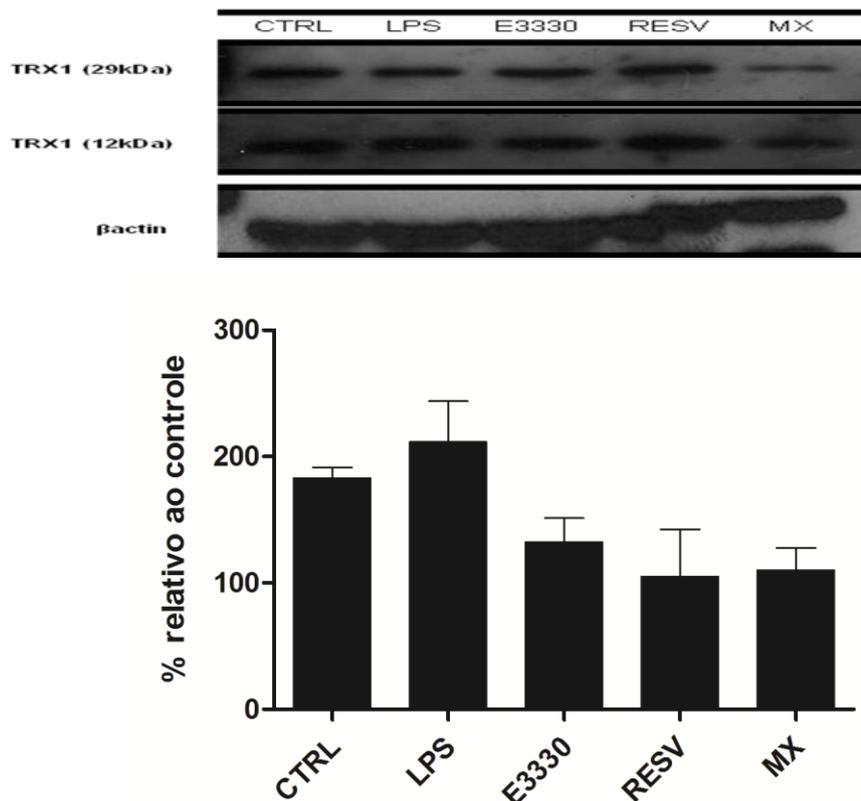
A translocação de NF $\kappa$ B para o núcleo tem sido demonstrada ocorrer e depender de diversos fatores, sendo um dos mais estudados a ativação da NADPH oxidase que após estímulo com LPS promove um aumento de ERO, e estes últimos, por sua vez promove a ativação de NF $\kappa$ B para o núcleo. Para tanto, foi observado os níveis de ERO após os tratamentos. Apesar da indução com LPS, os níveis de ERO celular não aumentaram em relação ao CTRL, embora logo após a adição dos inibidores de APE1/Ref-1, os níveis de ERO foram significativamente reduzidos como mostrado na Figura 14a. Adicionalmente, ensaios para verificar os níveis de 8-oxo-G demonstraram uma significativa redução nos níveis do referido dano oxidativo após adição dos inibidores de APE1/Ref-1 conforme demonstrado nas Figuras 14b. Semelhante ao observado no ensaio para medição de ERO não houve diferença significativa entre as células controle e estimuladas com LPS.



**Figura 14.** Verificação dos níveis de ERO (a) e do dano 8-oxo-G através de FITC-avidina (b). \* P<0.05 em relação ao tratamento com LPS.

## 5.8 Tiorredoxina tem seus níveis reduzidos após tratamento com inibidores de APE1/Ref-1

Uma das principais proteínas envolvidas com a função de oxiredução da APE1/Ref-1 é tiorredoxina. Esta é essencial para reduzir APE1/Ref-1 e consequentemente os fatores de transcrição, tais como NFkB, AP-1 e p53. Para tanto, foi avaliado os níveis proteicos de TRX com objetivo de investigar se os compostos inibidores possuem algum papel sobre a expressão desta proteína redox. Como observado, não houve diferença nos níveis proteicos de TRX após estímulo com LPS, no entanto seus níveis protéicos foram significativamente reduzidos pós-adição de MX (Figura 15).

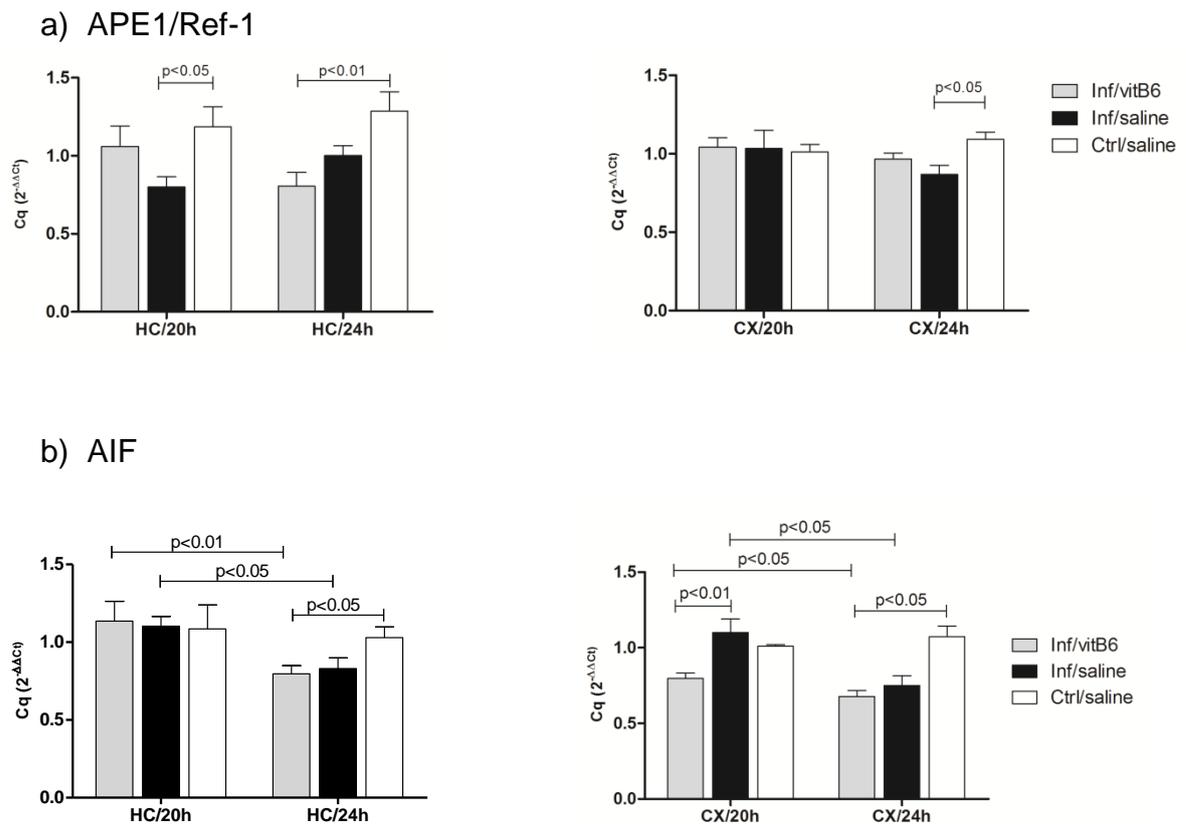


**Figura 15.** Análise da expressão de TRX após estímulo com LPS e adição de inibidores. O gráfico representa o resultado da densidade obtida a partir do western blot, mostrando uma redução na expressão de TRX após introdução de MX.

### 5.9. Níveis transcricionais dos genes APE1/Ref-1 e AIF

Todos os animais infectados desenvolveram meningite como esperado, o que foi confirmado pela presença de bactéria no LCR dos animais no tempo 18 h após infecção.

PCR em tempo real foi usada para comparar os níveis de RNAm dos genes APE1/Ref-1 e AIF durante MP aguda a 20 h e 24 h p.i. com aqueles que receberam tratamento com vitamina B6 e controles não infectados. Os níveis de RNAm de APE1/Ref-1 foram significativamente reduzidos no HC de ratos infectados após 20 h p.i., bem como, nos ratos com adição de vitamina B6 após 24 h p.i., comparados aos animais controles. Enquanto que, no CX, somente os ratos infectados após 24 h p.i. tiveram níveis mais baixos de APE1/Ref-1 comparados aos animais controles (Figura 16a). Por outro lado, AIF foi mostrado ter diferença significativa entre os grupos no HC após 20 h p.i., enquanto que os animais tratados com vitamina B6 24 h p.i. mostraram níveis de RNA reduzido comparado aos controles. Além disso, redução significativa de transcritos de AIF entre os dois tempos estudados foi observado (Figura 16b), sugerindo degradação de RNA dependente do tempo. No CX dos animais tratados com vitamina B6 20 h p.i., redução significativa nos níveis de RNAm foi observada comparada aos animais infectados, enquanto que no tempo 24 h, somente houve redução significativa de RNAm nos animais tratados com vitamina B6 quando comparado aos animais controles, semelhante ao encontrado no HC. Como observado no HC, houve significativa redução de transcritos no CX com o passar do tempo (de 20 para 24 h p.i.).

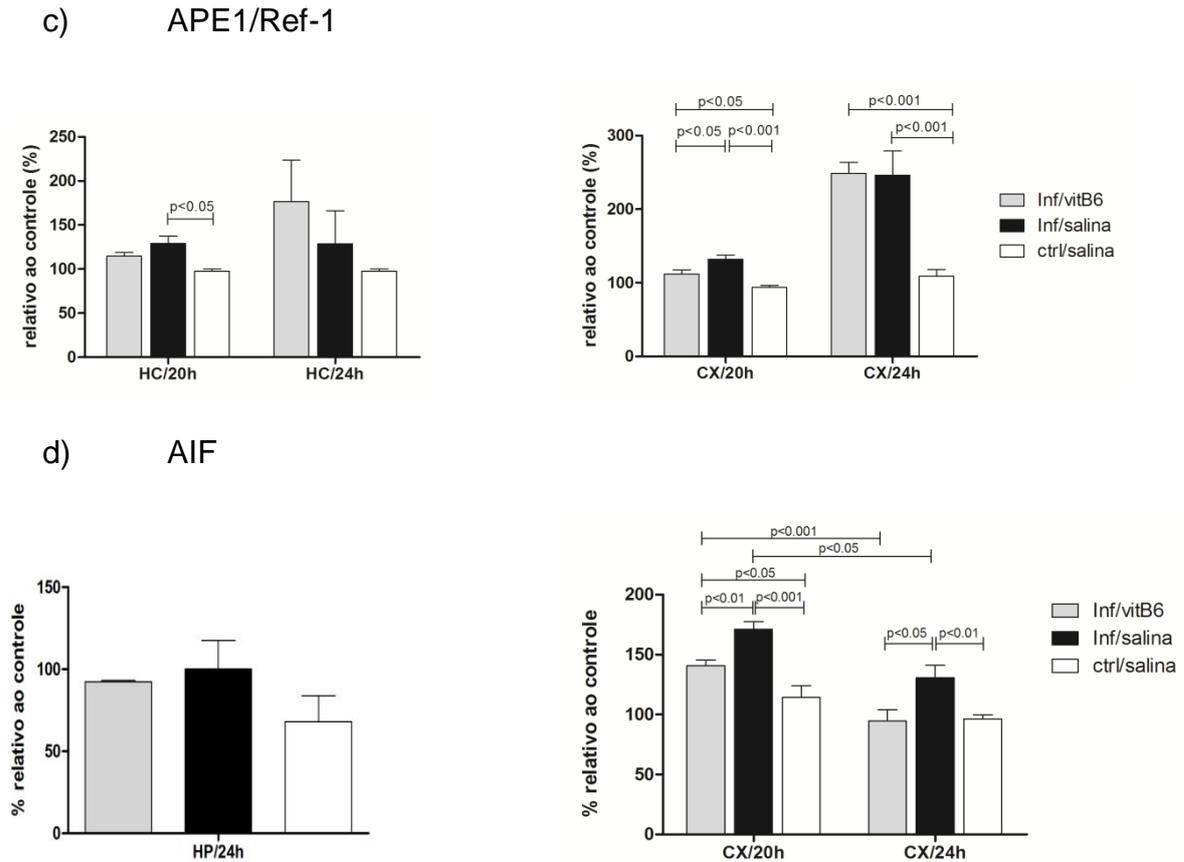


**Figura 16.** A expressão relativa dos genes APE1/Ref-1 (a) e AIF (b) foi calculada utilizando o método  $\Delta Cq$  e corrigido pela eficiência de amplificação. Ambos os genes tiveram sua expressão comparados com a expressão de GAPDH.

### 5.10 Níveis de expressão protéica de APE1/Ref-1 e AIF

Dados de expressão de APE1/Ref-1 revelaram elevados níveis protéicos no tecido cortical e hipocampal dos ratos estudados durante MP. Embora o acúmulo de APE1/Ref-1 tenha sido notado no HC de ratos infectados após 20 h p.i., a vitamina B6 não alterou significativamente a expressão de APE1/Ref-1 após sua introdução. Nenhuma mudança relativa a expressão de APE1/Ref-1 no HC dos ratos no tempo 24 h p.i. também foi observada (Figura 17a). No CX 20 h p.i., e após terapia com vitamina B6, APE1/Ref-1 teve seu nível reduzido quando comparado com os animais infectados (Figura 17b). Apesar da redução de APE1/Ref-1 após vitamina B6 no CX em 20 h p.i., animais controles tiveram uma redução mais significativa de APE1/Ref-



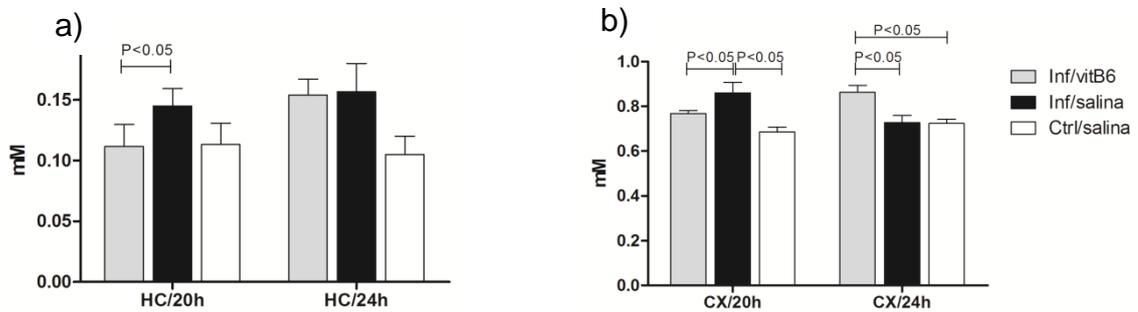


**Figura 17.** Níveis protéicos de APE1/Ref-1 e AIF no HC (a) e CX (b) nos tempos de 20h e 24h p.i.. Como observado em (a), APE1/Ref-1 dos animais com MP mostra uma redução de peso molecular. Enquanto que em (b), nos animais com MP no tempo 24h p.i. é detectada uma banda de APE1/Ref-1 com alto peso molecular. Os gráficos em (c) correspondem aos valores gerados a partir da densidade integrada para APE1/Ref-1 e em (d) para AIF. Em função de problemas técnicos laboratoriais faltou realizar o experimento para AIF HP 20h p.i..

### 5.11 Concentração de glutamato

Nossos resultados mostraram acúmulo de glutamato durante a infecção, com significativa redução após introdução da vitamina B6 (20 h p.i.) em ambos os tecidos, HC e CX (Figura 18a e Figura 18b). Diferentemente, no CX dos animais que receberam vitamina B6 no tempo 24 h p.i. foi observado acúmulo de glutamato,

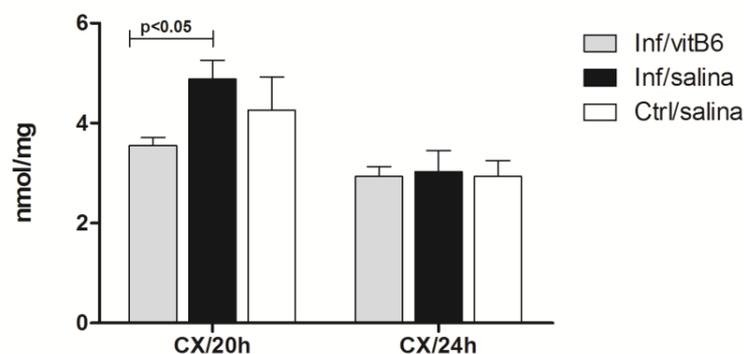
enquanto que no HC neste mesmo tempo nenhuma diferença foi observada entre os grupos.



**Figura 18.** Concentração de glutamato nos tempos 20 e 24 horas nos tecidos do HC (a) e CX (b). Vitamina B6 reduz os níveis de glutamato até 20h p.i..

### 5.12 Conteúdo de proteínas carboniladas

A capacidade da vitamina B6 reduzir danos oxidativos foi visto através do conteúdo de proteínas carboniladas. Córtex de animais infectados que receberam vitamina B6 (20 h p.i.) mostrou redução significativa do conteúdo de carbonilas quando comparados aos animais com MP, enquanto no tempo 24 h p.i. nenhuma diferença foi observada entre os grupos (Figura 19). No HC dos animais estudados não foram observadas diferenças no conteúdo de carbonilação entre os diferentes grupos nos dois tempos estudados (dados não mostrado).



**Figura 19.** Conteúdo de proteínas carboniladas no CX dos ratos com 20 e 24 h p.i.. Redução de proteínas carboniladas no tempo 20 h p.i. após adição de vitamina B6

foi observada. O gráfico referente ao HP não foi demonstrado em função da falta de replicatas experimentais.

## 6.0 Discussão

A partir dos dados obtidos neste estudo foi observado que a MB causada por *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* induz um perfil de expressão de cito/quimiocinas semelhante, embora apresentem algumas diferenças na expressão de alguns moduladores. Diab et al. (1999) mostraram que através da expressão de mRNA, *H. influenzae* induziu um padrão diferente de citocinas comparado a *S. pneumoniae*. Enquanto, Ostegaard e Benfield (2009) mostraram que os níveis do fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) foram significativamente mais elevados em pacientes com infecção por pneumococco do que naqueles pacientes com infecção meningocócica.

A concentração de IL-1 $\beta$  no LCR dos pacientes desse estudo não mostrou diferença significativa entre os patógenos pesquisados. No estudo de OHGA et al. (1994) o qual foram comparados três pacientes para cada patógeno, IL-1 $\beta$  mostrou níveis significativamente elevados durante MP em relação a MM, porém em outro estudo, no qual o número de pacientes por patógeno era superior, a concentração desta citocina ficou aproximadamente no mesmo nível em ambos patógenos (SHARIEF et al., 1992). Além do tamanho da amostra, é aceitável que fatores adicionais possam implicar em diferenças na indução de citocinas, tais como idade do hospedeiro e o tipo de cepa do patógeno (KORNELISSE ET AL., 1997). Sharief et al. (1992) observaram que a concentração de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no LCR dos pacientes com MB não era dependente da idade. Dulkerian et al. (1995) também demonstraram que crianças recém nascidas respondem a invasão do patógeno com liberação de citocinas em níveis comparáveis àquelas crianças mais velhas e adolescentes. Por outro lado, diferentes linhagens de *N. meningitis* parecem ser

capazes de induzir diferentes resultados (DAVENPORT et al., 2007; HOLUB et al., 2007) alterando a resposta imune.

TNF- $\alpha$  tem sido identificada como uma ferramenta complementar útil no diagnóstico da meningite, especialmente nos casos em que o exame no LCR não é conclusivo. E embora esta citocina pareça ser importante por dirigir diversos mecanismos relacionados à resposta imune, os dados observados na literatura quanto a sua expressão no LCR de pacientes com MP e MM ainda são bastante controversos. Por exemplo, Glimaker et al. (1993) observaram elevados níveis de TNF- $\alpha$  no LCR de pacientes com MM, enquanto que Kornelisse et al. (1997) observaram níveis mais elevados nos pacientes com MP. Além destes, em outro estudo realizado com um número maior de pacientes para cada tipo de meningite, os níveis de TNF- $\alpha$  foram praticamente idênticos (SHARIEF et al., 1992). Similarmente, os dados obtidos a partir do LCR dos pacientes do HGT mostram que esta citocina não foi diferencialmente expressa durante a meningite causada por *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*.

A citocina IL-6 tem sido identificada durante a MB, e alguns pesquisadores tem tentado associá-la com TNF- $\alpha$  para um diagnóstico diferencial de MB, mas até agora sem sucesso. Dulkerian et al. (1995) mostraram elevados níveis de IL-6 durante MP, enquanto para *N. meningitidis* somente uma amostra foi analisada. Entretanto, neste mesmo estudo, o autor declara que não foi encontrada diferença nos níveis da citocina IL-6 em MB causada por bactérias gram-negativa comparada à gram-positiva (DULKERIAN et al., 1995). Resultado semelhante para IL-6 foi obtido no LCR dos pacientes desse estudo. Semelhante ao observado para IL-6, não houve diferença significativa nos níveis de IL-10, CXCL8/IL-8, CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL2/MCP-1 no LCR dos pacientes com MP e MM dessa pesquisa. Corroborando,

alguns estudos não observaram diferenças significativa no LCR de pacientes com MP e MM para IL-10, CXCL8/IL-8, CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL2/MCP-1 (MASTROIANNI et al., 1998; KORNELISSE et al., 1997).

IFN $\gamma$  foi a proteína que mostrou concentração mais elevada nos pacientes com MP comparados a MM. Esta elevada produção de IFN $\gamma$  é atribuída principalmente bactérias gram-positivas, como *S. pneumoniae*, que induz muito mais IL-12 do que bactérias gram-negativa, como *N. meningitidis*. Também já foi observado que espécies gram-positivas induzem uma maior produção de IFN $\gamma$  em células mononucleares do sangue não fracionado do que espécies gram-negativa (KORNELISSE et al., 1998). Funcionalmente, IFN $\gamma$  estimula o mecanismo de defesa não específico de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, tais como fagocitose e secreção de ERO (BORISH e STEINKE, 2003). Além disso, os dados mostraram que IL-2 é mais elevado em MP do que em MM. Esta expressão diferencial de IFN $\gamma$  e IL-2 durante MP pode direcionar a inflamação a uma resposta imune Th1. Adicionalmente, um estudo mostrou que o reconhecimento de bactérias gram-positivas pelo macrófago e monócito é dependente da interação entre o RNA simples fita (ssRNA) da bactéria e um complexo de sinalização, que consiste dos adaptadores do TLR, tais como MyD88 e UNC-93B (DESHMUKH et al., 2010). Além do ssRNA, uma alta concentração do DNA bacteriano no LCR durante MP tem sido associada com altas concentrações de citocinas (CAROL et al., 2007).

A despeito do perfil geral destes mediadores no ambiente do SNC parecer muito similar, os níveis de IFN $\gamma$  e IL-2 observados neste estudo durante MP estão mais altos, indicando que *S. pneumoniae* parece ativar claramente uma resposta Th1. Como perspectiva, esta informação sobre a resposta Th pode facilitar o

desenvolvimento de vacinas baseadas na imunidade celular, bem como, fornecer genes candidatos para estudos de susceptibilidade à meningite.

Embora proteínas envolvidas diretamente na inflamação, como é o caso das citocinas, terem sido nas últimas décadas alvos para intervir na resposta inflamatória, outras proteínas tem emergido como importantes alvos para uma possível intervenção terapêutica durante a inflamação. Por exemplo, foi demonstrada que a presença de SNPs em APE1/ref-1 está associado a pacientes com MB, além de promover a redução na expressão de alguns moduladores inflamatórios (da SILVA et al., 2011). No presente estudo foram testados alguns inibidores da APE1/Ref-1, tais como, E3330, resveratrol e MX, na tentativa de intervir na resposta inflamatória. Por meio de ensaios específicos também mostramos que a inibição de APE1/Ref-1 reduz os níveis de ERO intracelulares e de danos oxidativos.

Inicialmente, um aumento de citocinas em células promonocíticas humana após estímulo com LPS foi observado neste estudo, no entanto somente as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  tiveram esse aumento significativo em relação ao controle não estimulado. A célula utilizada não demonstrou diferenças na expressão protéica de IL-1 $\beta$ , IL-2 e G-CSF. Diversos estudos tem mostrado aumento ou redução de mediadores inflamatórios nas células U937 após estímulo com LPS. Por exemplo, a expressão de prostraglandinas pela enzima ciclooxigenase (Cox) 1 e 2 é modulada pela indução de LPS (ARIAS-NEGRETE et al., 1995), bem como, moléculas de adesão celular, como a integrina  $\alpha 5\beta 1$  (ROMAN et al., 2004). Cito-/quimiocinas inflamatórias tais como, IL-6, IL-8 e IL-1 $\alpha$  têm sido mostradas aumentar significativamente após indução com LPS (ZHOU et al., 2012). Além disso, outros compostos como o hormônio imunomodulatório 1,25-

dihidroxitamina D3 tem mostrado elevar a expressão de IL-1 $\beta$ , assim como, os níveis de TNF- $\alpha$  em células U937 induzidas com LPS (FAGAN et al., 1991). Apesar dos pacientes com MB apresentarem um perfil de maior expressão de citocinas, enquanto que no modelo de inflamação *in vitro* com LPS esse perfil ser mais restrito, algumas das principais citocinas envolvidas na MB tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 foram observadas em ambos os modelos, o que permitiu o uso do modelo celular para estimar o modelo de MB humano.

O papel da APE1/Ref-1 sobre a inflamação já foi observado na resposta celular a TNF- $\alpha$  e a *H. pylori*. Nestes modelos de estudo, os níveis de IL-8 são significativamente reduzidos após silenciamento de APE1/Ref-1 (OHARA et al., 2006, 2009). Na linhagem celular U937 utilizada nesse estudo induzida com LPS houve significativa redução de citocinas após introdução de E3330. Mecanicamente, E3330 inibe ou bloqueia a função redox de APE1/Ref-1 impedindo a redução dos resíduos de cisteínas localizados no domínio de ligação ao DNA de p50 (NF- $\kappa$ B) e de Fos e Jun (AP-1). Isto resulta na incapacidade de NF- $\kappa$ B e AP-1 se ligarem as suas respectivas sequências de DNA alvo (NISHI et al., 2002; XANTHOUDAKIS et al., 1992). Em células HaCat e queratinócitos primários humanos, a atividade redox de APE1/Ref-1 possui um papel crucial na expressão de TNF- $\alpha$ , CXCL8/IL-8 e LL-37 mediados por TLR2 (LEE et al., 2009). Em células THP-1 oriundas de leucemia monocítica aguda, o composto E3330 impediu a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  que é um inibidor do NF $\kappa$ B, levando conseqüentemente a redução na expressão de TNF- $\alpha$  (GOTO et al., 1996). Um estudo recente com macrófagos de rato estimulados com LPS e tratados com E3330 suprimiu claramente a expressão de citocinas inflamatórias, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12, bem como, alguns mediadores inflamatórios como NO e prostaglandina E<sub>2</sub> (JEDINAK et al., 2011).

Até o momento nenhum estudo tem observado o efeito de MX sobre a expressão de citocinas, embora seu papel sobre a atividade de reparo tenha sido bastante estudada como um adjuvante na terapia antitumoral. Em nosso estudo, a MX promoveu uma significativa redução nos níveis de citocinas, bem como, promoveu um aumento de células paradas em G1 em relação ao tratamento com LPS. Já foi demonstrado que não é somente a perda do domínio redox de APE1/Ref-1 que leva a uma redução na atividade de NF- $\kappa$ B. A deleção do domínio C-terminal associado com a atividade AP endonuclease reduz significativamente a atividade de NF- $\kappa$ B, embora não modifique a capacidade da proteína reduzir a subunidade p50 de NF $\kappa$ B (GUAN et al., 2005). Estudos comparativos entre MX e E3330, também têm demonstrado que a inibição do reparo com MX não tem atividade inibitória sobre o crescimento celular e a progressão tumoral (ZOU et al., 2008; 2007).

Diferente dos compostos anteriormente citados, resveratrol é um composto que vem sendo bastante estudado devido ao seu potencial antioxidante e seu papel anticâncer, no entanto sua associação com a inibição do domínio redox de APE1/Ref-1 é recente, com isso poucos estudos tem demonstrado essa atividade. Nossos dados demonstraram uma redução significativa de citocinas no tratamento das células com resveratrol, porém, na concentração utilizada em nosso estudo, o composto não inibiu a atividade de reparo de DNA diante do plasmídeo com sítios AP, mostrando que o composto tem prioritariamente atividade de inibição redox. Por outro lado, em melanócitos superexpressando APE1/Ref-1 o composto resveratrol inibiu ambas as funções de reparo e redox de APE1/Ref-1 deixando as células mais sensíveis ao tratamento com dacarbazina. Além disso, nesta mesma pesquisa foi demonstrado através de estudos de modelagem tridimensional que resveratrol

interage com APE1/Ref-1 em regiões conhecidas como “*druggable pockets*” permitindo um encaixe molecular (YANG et al., 2005).

A regulação da expressão de citocinas que possuem sequências kappa B no seu promotor depende da presença das subunidades de NFκB no núcleo. O mecanismo que media essa translocação de NFκB para o núcleo tem sido demonstrado ocorrer e depender de diversos fatores, um dos mais estudados em macrófagos é a ativação da NADPH oxidase que após estímulo com LPS promove um aumento de ERO, e estes, por sua vez promove a translocação de NFκB para o núcleo (MORGAN e LIU, 2011). Song et al. (2007) demonstraram que além de ERO, o silenciamento de APE1/Ref-1 também inibiu a translocação de NFκB para o núcleo. Nossos dados demonstraram uma significativa redução nos níveis de ERO após adição dos inibidores em relação às células tratadas com LPS. No entanto, pouca alteração foi observada em relação à localização subcelular da subunidade p65 de NFκB após adição dos inibidores, que foi predominantemente nuclear após adição do LPS. Apenas os inibidores resveratrol e MX mostraram maior redução sobre a translocação nuclear de p65.

A localização subcelular de APE1/Ref-1 observada nas células U937 sem LPS foi vista ser expressamente nuclear. No entanto, após adição de LPS, APE1/Ref-1 ganha o espaço citoplasmático. Posteriormente ao tratamento com inibidores estudados ocorreu uma moderada redução de APE1/Ref-1 no citoplasma. WU et al. (2010) demonstraram que APE1/Ref-1 citoplasmática aumenta a ativação de NFκB em células de tumor de pulmão, porém após adição de resveratrol ocorre redução nesta ativação do fator de transcrição. Adicionalmente, Song et. al (2007) observaram que macrófagos RAW 247 estimulados com LPS requerem APE1/Ref-1 para permitir a translocação de NFκB (SONG et al., 2007). Portanto, dois fatores

parecem influenciar a translocação de NFkB para núcleo, a presença de APE1/Ref-1 citoplasmática/nuclear e os níveis de ERO. Em um estudo previamente citado com monócitos humanos foi observado que E3330 também suprimiu a produção de ERO reduzindo a ativação de NFkB (GOTO et al., 1996).

O papel das ERO na mediação da resposta inflamatória é evidente. No entanto, estas moléculas reativas não funcionam só como agentes sinalizadores, mas também podem levar a formação de danos oxidativos. Nesse estudo, a redução das ERO observada após a introdução dos inibidores de APE1/Ref-1 também levou a redução de 8-oxoG no DNA genômico. Meningite bacteriana é um exemplo clássico do efeito das ERO no mecanismo fisiopatológicos da infecção (KOEDEL e PFISTER, 1999). Um estudo avaliando a quantidade de 8-oxoG, principal produto do ataque das ERO ao DNA genômico, no LCR de crianças com MB mostrou um aumento significativo deste tipo de dano oxidativo (TSUKAHARA et al., 2010). A principal proteína responsável na remoção deste tipo de dano é a DNA glicosilase de 8-oxoG (OGG1), a qual tem sido mostrada ter sua atividade inibida em alterações redox da célula (BRAVARD et al., 2006). Estes dados sugerem um possível papel para a função redox de APE1/Ref-1 na regulação da atividade de OGG1.

A proteína APE1/Ref-1 pode regular a expressão de diversos genes através da redução de fatores de transcrição, no entanto, já foi demonstrado que ela também regula sua própria expressão através dos elementos negativos de resposta a cálcio (n-CaRE) presentes no seu promotor (IZUMI et al., 1996). Neste estudo apesar de observada a redução nos níveis de transcritos de APE1/Ref-1 após adição dos inibidores, os níveis proteicos não mudaram significativamente. Em células MCF-7 tratadas com E3330 e MX, os níveis proteicos de APE1/Ref-1 também não mudaram significativamente (CURTIS et al., 2009). Além da sua própria

expressão, APE1/Ref-1 regula a expressão do gene do hormônio da paratireóide através do mesmo mecanismo de interação com os n-CaRE. No entanto, a regulação transcricional desse hormônio é dependente do nível de APE1/Ref-1 acetilada presente no contexto nuclear (BHAKAT et al., 2003). Contraditoriamente, em outro estudo o aumento da acetilação de APE1/Ref-1 também promoveu o recrutamento da RNA pol II no promotor do gene MDR1 levando a um aumento da atividade transcricional (SENGUPTA et al., 2011). Portanto, é possível que a adição de inibidores da APE1/Ref-1 esteja alterando o padrão de acetilação da proteína levando a mudanças na regulação transcricional da própria proteína.

Diversas proteínas, além de APE1/Ref-1, estão regulando e mantendo a homeostase do estado redox da célula, tais com tioredoxinas, peroxiredoxinas e glutaredoxinas (HOLMGREN et al., 1989; NAKAMURA et al., 1997; HOFMANN et al., 2002). Dentre as proteínas citadas anteriormente, o mecanismo de interação de TRX com APE1 parece ser o mais elucidado. Ando et al. (2008) demonstraram que independente dos domínios redox e AP endonuclease, a enzima APE1/Ref-1 pode atuar como uma proteína chaperona redox, preparando outras proteínas para serem reduzidas por TRX e glutathione. Outros estudos, também tem mostrado tanto a associação física entre TRX e APE1/Ref-1, bem como, a localização nuclear de ambas as proteínas na potencialização da atividade redox de fatores de transcrição como AP-1 e PEBP2/CBF (HIROTA et al., 1997; AKAMATSU et al., 1997). No entanto, até o momento pouco se sabe como TRX participa dos processos redox da célula após a inibição de APE1/Ref-1 com os compostos utilizados neste estudo. Os dados observados mostraram que o perfil de expressão de TRX pouco variou após a adição de E3330 e resveratrol, no entanto foi significativamente reduzido após adição de MX. A formação de adutos no DNA pela ligação da MX aos sítios AP pode

sugerir algum mecanismo no bloqueio da transcrição, o que poderia estar levando a uma redução na expressão de TRX-1. Curiosamente, esses resultados observados no tratamento com MX não eram esperados, ou seja, esse potencial que o composto apresenta de inibir a transcrição e reduzir a expressão proteica não tinha sido demonstrado até o momento. Ainda mais, o efeito da inibição da atividade de reparo de APE1/Ref-1 não tinha ainda sido associada à redução de citocinas pró-inflamatórias, diferente do que é esperado para atividade redox. Atualmente, sabe-se que a ativação da transcrição requer um controle pós-traducional de histonas no DNA para permitir o recrutamento da RNA pol II ao promotor. Um deles é a demetilação da histona 3 pela demetilase específica de lisina 1 (LSD1), em que durante o processo de demetilação gera peróxido de hidrogênio levando a um dano no DNA do *enhancer* ou do promotor de um determinado gene que, por sua vez, ativa o recrutamento das enzimas do BER para reparar o dano oxidativo gerado (PERILLO et al., 2008). Se pensarmos que nos genes responsivos a LPS está ocorrendo um possível aumento da transcrição e conseqüentemente uma elevada quantidade de danos oxidativos no promotor desses genes, é possível também sugerir um aumento de adutos DNA-MX dificultando a transcrição de tais genes. van Essen et al. (2010), demonstraram por meio de imunoprecipitação da cromatina que a LSD1 ocupa o promotor de diversos genes alvos de NFkB. Recentemente, Janzer et al. (2012) publicaram um trabalho mostrando que LSD1 atua sinergisticamente com a deacetilase de histona 1 (HDAC1) na repressão de citocinas pró-inflamatórias. Desse modo, a inibição da atividade de reparo de APE1/Ref-1 aliada a atividade de LSD1, ou mesmo de outras proteínas, podem ser um importante mecanismo na regulação da transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória.

Além do papel redox de APE1/Ref-1 atuando na expressão de citocinas, um grande número de artigos tem demonstrado alterações na expressão desta proteína durante uma variedade de modelos de estresse oxidativo no cérebro (DAGCI et al., 2009; VASKO et al., 2005). Por exemplo, em modelo de isquemia global em ratos, em que ocorre grande produção de ERO, a expressão de APE1/Ref-1 foi reduzida nos neurônios CA1 do hipocampo após 2 dias, e esta redução precedeu a fragmentação de DNA, sugerindo que a falha no reparo de DNA pode ter levado as células a apoptose (KAWASE et al., 1999). Em outro modelo de injúria no cordão espinhal de ratos, os níveis de transcrito de APE1 aumentam e correlacionam com os danos de DNA na região caudal do cordão espinhal após a lesão (DAGCI et al., 2008). A doença de Alzheimer (AD) é um exemplo de doença que causa neurodegeneração, e um dos principais motivos é a produção de ERO causada pela indução da proteína beta amiloide. Na AD, é observada uma expressão aumentada de APE1/Ref-1 nuclear suportando uma resposta ao estresse oxidativo (MARCON et al., 2009).

Entretanto, até o momento nenhum estudo tinha observado a expressão de APE1/Ref-1 em modelo experimental de meningite pneumocócica. Nesse estudo foi observado que a meningite pneumocócica induz alta expressão de APE1/Ref-1 principalmente no CX, e ela é reduzida após terapia com vitamina B6 mais marcadamente até 20 h p.i.. Esses dados sugerem a necessidade do BER para reparar os danos causados pelo estresse oxidativo gerados pela resposta inflamatória (DRUZHYNIA et al., 2005; JAISWAL et al., 2000). No CX após 24 h p.i., uma banda com peso molecular em torno de 70 kda foi observada nos resultados do western blot usando o anticorpo contra APE1/Ref-1 nos animais infectados com e sem vitamina B6. Embora, esta banda de alto peso molecular não tenha sido

completamente identificada e caracterizada, nós sugerimos um possível mecanismo de modificação pós traducional que pode estar relacionado com a degradação, uma vez que APE1/Ref-1 (37 kDa) e AIF demonstram níveis mais baixos no tempo 24 h p.i. para ambos os níveis de proteínas e RNAm. Em um ensaio preliminar, no qual foi realizada a imunoprecipitação de APE1/Ref-1, seguido do sequenciamento peptídico através de espectrometria de massa, foi observado a presença de uma subunidade beta do proteossomo, o que corrobora com a hipótese de que APE1/Ref-1 durante a infecção está sendo direcionada para a degradação (APÊNDICE 1). Além disso, a proteína ubiquitina E3 ligase MDM2, envolvida na ubiquitinação de p53 e responsável por dirigí-la a degradação, já foi demonstrada interagir diretamente com APE1/Ref-1 e promover sua ubiquitinação, embora a real função da ubiquitinação de APE1/Ref-1 não esteja clara (BUSSO et al., 2009).

Apesar do tecido hipocampal não demonstrar níveis tão elevados de APE1/Ref-1 durante a MP como o tecido cortical, uma peculiar modificação em APE1/Ref-1 foi evidenciada. No hipocampo dos animais infectados uma APE1/Ref-1 de menor peso molecular (34 kDa) foi observada, enquanto que nos animais tratados com vitamina B6 não ocorreu este evento. Yoshida et al. 2003 demonstraram em células humanas promielocíticas HL-60 que a forma menor de APE1/Ref-1 estava envolvida na apoptose e fragmentação do DNA, e sua ativação é mediada pela caspase-3 (YOSHIDA et al. 2003). Interessantemente, apoptose é o principal tipo de morte celular descrita no hipocampo durante MP e também é mediada via caspase-3 (LEIB et al., 1996; GIANINAZZI et al., 2003). Outros estudos mostraram que a perda do sinal de localização nuclear de APE1/Ref-1 é um fenômeno que precede a fragmentação de DNA em neurônios apoptóticos

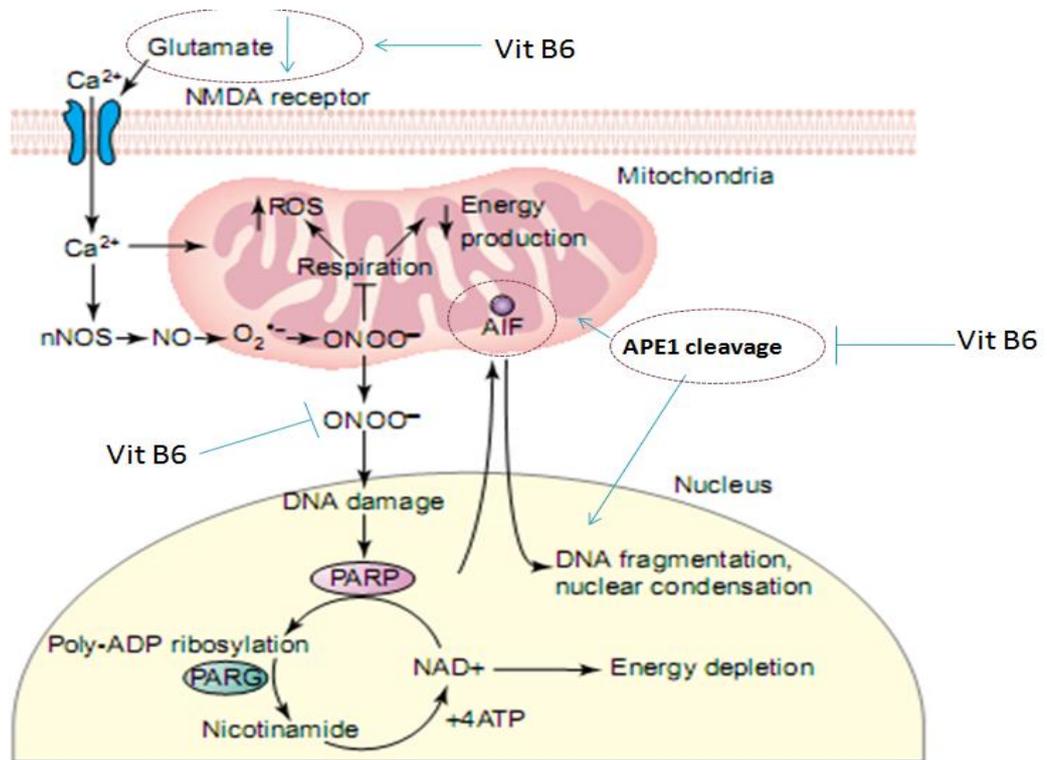
(WALTON et al., 1997; KAWASE et al., 1999). Esta observação sugere um papel protetor para a vitamina B6 no hipocampo de ratos durante MP.

AIF é uma proteína envolvida em morte celular independente de caspase-3 e em ambos os tecidos cortical e hipocampal dos ratos infectados mostrou-se elevado, principalmente no tempo 20 h. Contudo, após adição da vitamina B6, seus níveis reduziram significativamente. Um possível mecanismo que explica a redução de AIF após a adição da vitamina B6 é a também observada redução de glutamato. Esse aminoácido é precursor do ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor que age na inibição de neurônios. Por conseguinte, a enzima descarboxilase de glutamato responsável em sintetizar GABA utiliza a vitamina B6 como cofator. Com isso, a redução de glutamato pelo possível aumento na síntese de GABA nos ratos tratados com vitamina B6 sugere também uma redução nos níveis de AIF, bem como de ERO. Uma vez que, durante a ativação dos receptores NMDA pelo glutamato ocorre um rápido influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  resultando em elevados níveis de superóxidos e outros radicais genotóxicos (YANG et al., 2011).

A redução dos níveis de ERO no tecido cortical após introdução da vitamina B6 pode ser observada pela redução de proteínas carboniladas e pela redução da expressão de APE1/Ref-1. Já que foi proposto anteriormente que os níveis de APE1/Ref-1 estavam relacionados aos níveis de ERO. Em outro estudo a vitamina B6 já foi proposta promover um efeito protetor sobre células piramidais do HC da região CA1 de danos isquêmicos (HWANG et al., 2007).

Portanto, este estudo sugere que durante MP níveis mais altos de glutamato induzem a produção de ERO e a requisição de APE1/Ref-1. Ao mesmo tempo, mudanças na permeabilidade da membrana da mitocôndria promovem a liberação de AIF e dispara apoptose. Por outro lado, a entrada de vitamina B6 reduz as

concentrações de glutamato via formação de GABA, reduzindo a concentração de ERO, a demanda por APE1/Ref-1 e a liberação de AIF da mitocôndria como demonstrado no modelo proposto (Figura 20).



**Figura 20.** Modelo proposto da intervenção da vitamina B6 sobre o glutamato, ERO, APE1/Ref-1 e AIF. Adaptado de Hong et al., 2004.

## 7.0 Conclusão

Nesse estudo, foi realizada uma descrição do perfil de expressão de algumas citocinas e quimiocinas no LCR de pacientes com MP e MM com o objetivo de ganhar um melhor entendimento na sequência dos eventos inflamatórios desencadeados com a infecção. E apesar de ter sido observado poucas diferenças na expressão de tais moduladores entre MP e MM, o mediador IFN $\gamma$  parece ter um importante papel na resposta inflamatória das meningites causada por *S. pneumoniae*. A modulação nos níveis de citocinas durante a meningite pode ser uma estratégia útil para um melhor prognóstico em relação a morbidade e mortalidade pós infecção.

A identificação de novas proteínas e mecanismos envolvidos com a fisiopatologia da MB é uma importante estratégia para o desenvolvimento de terapias mais adequadas que tenham por finalidade ajudar a reduzir as sequelas causadas por esta infecção. Neste trabalho, foi observado que a inibição da proteína de reparo de DNA, APE1/Ref-1, com os inibidores E3330, MX e Resv nas concentrações utilizadas foi capaz de modular a resposta inflamatória de monócitos humanos estimulados com LPS. Também foi observado que a participação das ERO sobre esta modulação tem um papel importante. Embora, um mecanismo que explique a associação entre a inibição da atividade de reparo de APE1/Ref-1 por MX e a redução das citocinas precisa ser melhor investigado.

Além da inibição química de APE1/Ref-1, a introdução da vitamina B6 em ratos com MP demonstrou contribuir para a redução de danos celulares, devido a sua capacidade de reduzir os níveis de glutamato e conseqüentemente das ERO, o que resulta numa menor expressão das proteínas APE1/Ref-1 e AIF.

Considerando que o estresse oxidativo gerado pela inflamação é um dos principais mecanismos associado às sequelas da MB, terapias que modulem a resposta inflamatória, como a inibição de APE1/Ref-1, associada a uma terapia antioxidante, como a vitamina B6, parece ser uma importante combinação para melhorar o prognóstico da MB. Além disso, as terapias apresentadas nesse estudo são seguras e de baixo custo. Considerando que componentes tais como, resveratrol e da vitamina B6, podem ser encontradas em alimentos. Portanto, a partir deste estudo podem ser vislumbradas terapias capazes de reduzir os danos causados pela MB. Embora, outros ensaios que avaliem melhor e mais adequadamente a citotoxicidade de cada composto, antes de partir para estudos clínicos, sejam necessários. Além disso, esse estudo mostra que APE1/Ref-1 parece ter um importante papel na fisiopatologia da MB e ser um alvo de terapias antiinflamatórias.

## 8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKALIN, H. et al. Cerebrospinal fluid interleukin-1 beta/interleukin-1 receptor antagonist balance and tumor necrosis factor-alpha concentrations in tuberculous, viral and acute bacterial meningitis. **Scand J Infect Dis**, v.26, n.6, p.667-74, 1994.

AKAMATSU, Y. et al. Redox regulation of the DNA binding activity in transcription factor PEBP2. The roles of two conserved cysteine residues. **J Biol Chem**, v.272, n.23, Jun 6, p.14497-500, 1997.

AMADIO, S. et al. Differences in the neurotoxicity profile induced by ATP and ATPgammaS in cultured cerebellar granule neurons. **Neurochem Int**, v.47, n.5, Oct, p.334-42, 2005.

AMES, B. N. Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. **Environ Mol Mutagen**, v.14 Suppl 16, p.66-77, 1989.

AMES, B. N. e GOLD, L. S. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. **Mutat Res**, v.250, n.1-2, Sep-Oct, p.3-16, 1991.

ANDO, K. et al. A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF-kappaB and AP-1, and activation of their DNA-binding activity. **Nucleic Acids Res**, v.36, n.13, Aug, p.4327-36, 2008.

ANTHONY, S. P. et al. A phase I study of daily oral TRC102 (methoxyamine) to enhance the therapeutic effects of pemetrexed in patients with advanced refractory cancer. **J Clin Oncol** v.27, n.15, 2009.

ARIAS-NEGRETE, S. et al. Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v.208, n.2, Mar 17, p.582-9, 1995.

ASANO, T. et al. IL-17 is elevated in cerebrospinal fluids in bacterial meningitis in children. **Cytokine**, v.51, n.1, Jul, p.101-6, 2010.

AU, W. W. et al. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. **Environ Health Perspect**, v.111, n.15, Nov, p.1843-50, 2003.

AUBURTIN, M. et al. Detrimental role of delayed antibiotic administration and penicillin-nonsusceptible strains in adult intensive care unit patients with pneumococcal meningitis: the PNEUMOREA prospective multicenter study. **Crit Care Med**, v.34, n.11, Nov, p.2758-65, 2006.

BAETHGEN, L. F. et al. Epidemiology of meningococcal disease in southern Brazil from 1995 to 2003, and molecular characterization of *Neisseria meningitidis* using multilocus sequence typing. **Trop Med Int Health**, v.13, n.1, Jan, p.31-40, 2008.

BEDFORD, H. et al. Meningitis in infancy in England and Wales: follow up at age 5 years. **BMJ**, v.323, n.7312, Sep 8, p.533-6, 2001.

BELLAC, C. L. et al. Pneumococcal meningitis causes accumulation of neurotoxic kynurenine metabolites in brain regions prone to injury. **Neurobiol Dis**, v.24, n.2, Nov, p.395-402, 2006.

BENNETT, S. E. et al. UV-catalyzed cross-linking of Escherichia coli uracil-DNA glycosylase to DNA. Identification of amino acid residues in the single-stranded DNA binding site. **J Biol Chem**, v.269, n.34, Aug 26, p.21870-9, 1994.

BERNSTEIN, C. et al. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. **Mutat Res**, v.511, n.2, Jun, p.145-78, 2002.

BHAKAT, K. K. et al. Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene. **Embo J**, v.22, n.23, Dec 1, p.6299-309, 2003.

BIFRARE, Y. D. et al. Bacterial meningitis causes two distinct forms of cellular damage in the hippocampal dentate gyrus in infant rats. **Hippocampus**, v.13, n.4, p.481-8, 2003.

BLACK, S. e SHINEFIELD, H. Vaccines and otitis media. **Pediatr Ann**, v.29, n.10, Oct, p.648-51, 2000.

BORISH, L. C. e STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v.111, n.2 Suppl, Feb, p.S460-75, 2003.

BRANDILEONE, M. C. et al. Distribution of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive infections over a 16-year period in the greater Sao Paulo area, Brazil. **J Clin Microbiol**, v.33, n.10, Oct, p.2789-91, 1995.

BRANDTZAEG, P. e VAN DEUREN, M. Current concepts in the role of the host response in *Neisseria meningitidis* septic shock. **Curr Opin Infect Dis**, v.15, n.3, Jun, p.247-52, 2002.

BRAVARD, A. et al. Redox regulation of human OGG1 activity in response to cellular oxidative stress. **Mol Cell Biol**, v.26, n.20, Oct, p.7430-6, 2006.

BRETON, J. et al. Functional characterization and mechanism of action of recombinant human kynurenine 3-hydroxylase. **Eur J Biochem**, v.267, n.4, Feb, p.1092-9, 2000.

BRIN, M. e BAUERNFEIND, J. C. Vitamin needs of the elderly. **Postgrad Med**, v.63, n.3, Mar, p.155-9, 162-3, 1978.

BROUWER, M. C. e Van De Beek, D. [Bacterial meningitis]. **Ned Tijdschr Tandheelkd**, v.119, n.5, May, p.238-42. 2012.

BRYAN, J. P. et al. Etiology and mortality of bacterial meningitis in northeastern Brazil. **Rev Infect Dis**, v.12, n.1, Jan-Feb, p.128-35, 1990.

BUSSO, C. S. et al. Ubiquitination of mammalian AP endonuclease (APE1) regulated by the p53-MDM2 signaling pathway. **Oncogene**, v.28, n.13, Apr 2, p.1616-25, 2009.

BYINGTON, C. L. et al. Temporal trends of invasive disease due to *Streptococcus pneumoniae* among children in the intermountain west: emergence of nonvaccine serogroups. **Clin Infect Dis**, v.41, n.1, Jul 1, p.21-9, 2005.

CAO, X. et al. Oxidoreductive modification of two cysteine residues in paired domain by Ref-1 regulates DNA-binding activity of Pax-8. **Biochem Biophys Res Commun**, v.297, n.2, Sep 20, p.288-93, 2002.

CARROL, E. D. et al. High pneumococcal DNA loads are associated with mortality in Malawian children with invasive pneumococcal disease. **Pediatr Infect Dis J**, v.26, n.5, May, p.416-22, 2007.

CHIARUGI, A. et al. Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid. **J Neurochem**, v.77, n.5, Jun, p.1310-8, 2001.

CHUMNANTANA, R. et al. Vitamin B6 compounds prevent the death of yeast cells due to menadione, a reactive oxygen generator. **Biochim Biophys Acta**, v.1722, n.1, Feb 11, p.84-91, 2005.

CHUN-CHE, L. e MEI-CHIN, Y. Vitamins B depletion, lower iron status and decreased anti-oxidative defense in patients with chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alfa and ribavirin. **Clinical Nutrition**, v.28, p.34-38, 2009.

COIMBRA, R. S. et al. Gene expression in cortex and hippocampus during acute pneumococcal meningitis. **BMC Biol**, v.4, p.15, 2006.

COPPEDÈ F., MIGLIORE L. Evidence Linking Genetics, Environment, and Epigenetics to Impaired DNA Repair in Alzheimer's Disease. **J Alz Dis**, v. 20, p. 953-966, 2010

CORDEIRO, S. M. et al. Hospital-based surveillance of meningococcal meningitis in Salvador, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.101, n.11, Nov, p.1147-53, 2007.

CURTIS, C. D. et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 alters estrogen receptor activity and estrogen-responsive gene expression. **Mol Endocrinol**, v.23, n.9, Sep, p.1346-59, 2009.

DA SILVA, T. A. et al. SNPs in DNA repair genes associated to meningitis and host immune response. **Mutat Res**, v.713, n.1-2, Aug 1, p.39-47, 2011.

DAGCI, T. et al. Alterations in the expression of the apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE/ref-1) and DNA damage in the caudal region of acute and chronic spinal cord injured rats treated by embryonic neural stem cells. **Physiol Res**, v.58, n.3, p.427-34, 2009.

DALAL, I. et al. Cytokine profile in cerebrospinal fluid of children with echovirus type 4 meningitis. **Pediatr Neurol**, v.29, n.4, Oct, p.312-6, 2003.

DAS, M. e DAS, D. K. Resveratrol and cardiovascular health. **Mol Aspects Med**, v.31, n.6, Dec, p.503-12, 2010.

DAVENPORT, V. et al. Regulation of Th-1 T cell-dominated immunity to *Neisseria meningitidis* within the human mucosa. **Cell Microbiol**, v.9, n.4, Apr, p.1050-61, 2007.

DAVIET, S. et al. Major oxidative products of cytosine are substrates for the nucleotide incision repair pathway. **DNA Repair (Amst)**, v.6, n.1, Jan 4, p.8-18, 2007.

DAVISON, K. L. e RAMSAY, M. E. The epidemiology of acute meningitis in children in England and Wales. **Arch Dis Child**, v.88, n.8, Aug, p.662-4, 2003.

DAWSON, K. G. et al. Fifteen years of experience with bacterial meningitis. **Pediatr Infect Dis J**, v.18, n.9, Sep, p.816-22, 1999.

DE MORAES, J. C. e GUEDES JDA, S. [The epidemiology of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in a metropolitan area, Brazil, 1960-1977]. **Rev Saude Publica**, v.24, n.5, Oct, p.348-60, 1990.

DE SOUZA, F. R. et al. Association of kynurenine aminotransferase II gene C401T polymorphism with immune response in patients with meningitis. **BMC Med Genet**, v.12, p.51, 2011.

DEMPLE, B. et al. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.24, Dec 15, p.11450-4, 1991.

DESHMUKH, S. D. et al. Macrophages recognize streptococci through bacterial single-stranded RNA. **EMBO Rep**, v.12, n.1, Jan, p.71-6, 2010.

DIAB, A. et al. Neutralization of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and MIP-1alpha attenuates neutrophil recruitment in the central nervous system during experimental bacterial meningitis. **Infect Immun**, v.67, n.5, May, p.2590-601, 1999.

DIANOV, G. et al. Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. **Mol Cell Biol**, v.12, n.4, Apr, p.1605-12, 1992.

DOETSCH, P. W. e CUNNINGHAM, R. P. The enzymology of apurinic/aprimidinic endonucleases. **Mutat Res**, v.236, n.2-3, Sep-Nov, p.173-201, 1990.

DRUZHYNIA, N. M. et al. Cytokines induce nitric oxide-mediated mtDNA damage and apoptosis in oligodendrocytes. Protective role of targeting 8-oxoguanine glycosylase to mitochondria. **J Biol Chem**, v.280, n.22, Jun 3, p.21673-9, 2005.

DULKERIAN, S. J. et al. Cytokine elevations in infants with bacterial and aseptic meningitis. **J Pediatr**, v.126, n.6, Jun, p.872-6, 1995.

ECHCHANNAOUI, H. et al. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. **J Infect Dis**, v.186, n.4, p. 798–806, 2002.

EDWARDS, M. et al. APE/Ref-1 responses to oxidative stress in aged rats. **J Neurosci Res**, v.54, n.5, Dec 1, p.635-8, 1998.

EMA, M. et al. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 $\alpha$  in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. **Embo J**, v.18, n.7, Apr 1, p.1905-14, 1999.

ERLANDER, M. G. et al. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. **Neuron**, v.7, n.1, Jul, p.91-100, 1991.

ERLANDER, M. G. e TOBIN, A. J. The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. **Neurochem Res**, v.16, n.3, Mar, p.215-26, 1991.

ESCOSTEGUY, C. C. et al. [Epidemiologic surveillance and evaluation of meningitis hospital care]. **Rev Saude Publica**, v.38, n.5, Oct, p.657-63, 2004.

ESKOLA, J. Foresight in medicine: current challenges with Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. **J Intern Med**, v.267, n.3, Mar, p.241-50. 2010.

EVANS, A. R. et al. Going APE over ref-1. **Mutat Res**, v.461, n.2, Oct 16, p.83-108, 2000.

FAGAN, D. L. et al. The human myelomonocytic cell line U-937 as a model for studying alterations in steroid-induced monokine gene expression: marked enhancement of lipopolysaccharide-stimulated interleukin-1 beta messenger RNA levels by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Mol Endocrinol**, v.5, n.2, Feb, p.179-86, 1991.

FAN, J. e WILSON, D. M., 3RD. Protein-protein interactions and posttranslational modifications in mammalian base excision repair. **Free Radic Biol Med**, v.38, n.9, May 1, p.1121-38, 2005.

FAUCI, A. S. Infectious diseases: considerations for the 21st century. **Clin Infect Dis**, v.32, n.5, Mar 1, p.675-85, 2001.

FIDA, N. M. et al. Interleukin-1alpha, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in children with sepsis and meningitis. **Pediatr Int**, v.48, n.2, Apr, p.118-24, 2006.

\_\_\_\_\_. Serum concentrations of interleukin-1 alpha, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in neonatal sepsis and meningitis. **Saudi Med J**, v.27, n.10, Oct, p.1508-14, 2006.

FISHEL, M. L. e KELLEY, M. R. The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. **Mol Aspects Med**, v.28, n.3-4, Jun-Aug, p.375-95, 2007.

FORTNUM, H. M. Hearing impairment after bacterial meningitis: a review. **Arch Dis Child**, v.67, n.9, Sep, p.1128-33, 1992.

FRIEDBERG, E. C. Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair. **Trends Biochem Sci**, v.20, n.10, Oct, p.381, 1995.

FRIEDLAND, J. S. Cytokines, phagocytosis, and Mycobacterium tuberculosis. **Lymphokine Cytokine Res**, v.12, n.2, Apr, p.127-33, 1993.

FRITZ, G. et al. APE/Ref-1 and the mammalian response to genotoxic stress. **Toxicology**, v.193, n.1-2, Nov 15, p.67-78, 2003.

GAIDDON, C. et al. Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. **Embo J**, v.18, n.20, Oct 15, p.5609-21, 1999.

GENCER, M. et al. DNA repair genes in Parkinson's disease. **Genet Test Mol Biomarkers**, Jun16, n.6, p.504-507, 2012.

GEORGIADIS, M. M. et al. Evolution of the redox function in mammalianapurinic/aprimidinic endonuclease. **Mutat Res**, v.643, n.1-2, Aug 25, p.54-63, 2008.

GIANINAZZI, C. et al. Caspase-3 mediates hippocampal apoptosis in pneumococcal meningitis. **Acta Neuropathol**, v.105, n.5, May, p.499-507, 2003.

GOETGHEBUER, T. et al. Outcome of meningitis caused by Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae type b in children in The Gambia. **Trop Med Int Health**, v.5, n.3, Mar, p.207-13, 2000.

GOTO, M. et al. Inhibitory effect of E3330, a novel quinone derivative able to suppress tumor necrosis factor-alpha generation, on activation of nuclear factor-kappa B. **Mol Pharmacol**, v.49, n.5, May, p.860-73, 1996.

GRIMWOOD, K. et al. Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. **Arch Dis Child**, v.83, n.2, Aug, p.111-6, 2000.

GUAN, Z. et al. Loss of redox factor 1 decreases NF-kappaB activity and increases susceptibility of endothelial cells to apoptosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.25, n.1, Jan, p.96-101, 2005.

GUIDETTI, P. e SCHWARCZ, R. 3-Hydroxykynurenine potentiates quinolinate but not NMDA toxicity in the rat striatum. **Eur J Neurosci**, v.11, n.11, Nov, p.3857-63, 1999.

GUILARTE, T. R. e WAGNER, H. N., JR. Increased concentrations of 3-hydroxykynurenine in vitamin B6 deficient neonatal rat brain. **J Neurochem**, v.49, n.6, Dec, p.1918-26, 1987.

GUILLET, M. e BOITEUX, S. Endogenous DNA abasic sites cause cell death in the absence of Apn1, Apn2 and Rad1/Rad10 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Embo J**, v.21, n.11, Jun 3, p.2833-41, 2002.

HABERL, R. L. et al. Is nitric oxide involved as a mediator of cerebrovascular changes in the early phase of experimental pneumococcal meningitis? **Neurol Res**, v.16, n.2, Apr, p.108-12, 1994.

HADI, M. Z. et al. Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. **Nucleic Acids Res**, v.28, n.20, Oct 15, p.3871-9, 2000.

HAINAUT, P. e MILNER, J. Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro. **Cancer Res**, v.53, n.19, Oct 1, p.4469-73, 1993.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutat Res**, v.443, n.1-2, Jul 15, p.37-52, 1999.

HANSON, S. et al. Redox factor 1 (Ref-1) enhances specific DNA binding of p53 by promoting p53 tetramerization. **Oncogene**, v.24, n.9, Feb 24, p.1641-7, 2005.

HARMAN, D. Role of free radicals in aging and disease. **Ann N Y Acad Sci**, v.673, Dec 26, p.126-41, 1992.

HAUSLER, K. G. et al. Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. **Eur J Neurosci**, v.16, n.11, Dec, p.2113-22, 2002.

HERRING, C. J. et al. Levels of the DNA repair enzyme human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1, APEX, Ref-1) are associated with the intrinsic radiosensitivity of cervical cancers. **Br J Cancer**, v.78, n.9, Nov, p.1128-33, 1998.

HESSLE, C. et al. Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. **Infect Immun**, v.68, n.6, Jun, p.3581-6, 2000.

HIRANO, T. et al. Biological and clinical aspects of interleukin 6. **Immunol Today**, v.11, n.12, Dec, p.443-9, 1990.

HIROTA, K. et al. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.8, Apr 15, p.3633-8, 1997.

\_\_\_\_\_. [Reactive oxygen intermediates, thioredoxin, and Ref-1 as effector molecules in cellular signal transduction]. **Tanpakushitsu Kakusan Koso**, v.44, n.15 Suppl, Nov, p.2414-9, 1999.

HODGSON, A. et al. Survival and sequelae of meningococcal meningitis in Ghana. **Int J Epidemiol**, v.30, n.6, Dec, p.1440-6, 2001.

HOFFMANN, G. F. et al. Pyridoxal 5'-phosphate may be curative in early-onset epileptic encephalopathy. **J Inherit Metab Dis**, v.30, n.1, Feb, p.96-9, 2007.

HOFMANN, B. et al. Peroxiredoxins. **Biol Chem**, v.383, n.3-4, Mar-Apr, p.347-64, 2002.

HOLMGREN, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. **J Biol Chem**, v.264, n.24, Aug 25, p.13963-6, 1989.

HOLUB, M. et al. Neisseria meningitidis strains from patients with invasive meningococcal disease differ in stimulation of cytokine production. **Folia Microbiol (Praha)**, v.52, n.5, p.525-8, 2007.

HONG, S. J. et al. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death : PARP-1 and AIF signaling. **Trend Pharm Sci**, v.25, n.5, May, p.259-264, 2004.

HORTON, J. K. et al. Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase beta-dependent long patch base excision repair. **J Biol Chem**, v.275, n.3, Jan 21, p.2211-8, 2000.

HOUSER, C. R. e ESCLAPEZ, M. Localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase in the rat hippocampal formation. **Hippocampus**, v.4, n.5, Oct, p.530-45, 1994.

HSIA, S. M. et al. Effects of resveratrol, a grape polyphenol, on uterine contraction and Ca(2)+ mobilization in rats in vivo and in vitro. **Endocrinology**, v.152, n.5, May, p.2090-9, 2011.

HU, J. et al. Phosphorylation of human oxoguanine DNA glycosylase (alpha-OGG1) modulates its function. **Nucleic Acids Res**, v.33, n.10, p.3271-82, 2005.

\_\_\_\_\_. The intra-S phase checkpoint targets Dna2 to prevent stalled replication forks from reversing. **Cell**, v.149, n.6, Jun 8, p.1221-32, 2002.

HU, J. J. et al. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. **Carcinogenesis**, v.22, n.6, Jun, p.917-22, 2001.

HWANG, I. K. et al. Time course of changes in pyridoxal 5'-phosphate (vitamin B6 active form) and its neuroprotection in experimental ischemic damage. **Exp Neurol**, v.206, n.1, Jul, p.114-25, 2007.

IZUMI, T. et al. Negative regulation of the major human AP-endonuclease, a multifunctional protein. **Biochemistry**, v.35, n.47, Nov 26, p.14679-83, 1996.

JAISWAL, M. et al. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. **Cancer Res**, v.60, n.1, Jan 1, p.184-90, 2000.

JANZER, A. et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylase 1 (HDAC1) synergistically repress proinflammatory cytokines and classical complement pathway components. **Biochem Biophys Res Commun**, v.421, n.4, May 18, p.665-70. 2012

JAYARAMAN, L. et al. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. **Genes Dev**, v.11, n.5, Mar 1, p.558-70, 1997.

JEDINAK, A. et al. Apurinic/Apyrimidinic endonuclease 1 regulates inflammatory response in macrophages. **Anticancer Res**, v.31, n.2, Feb, p.379-85, 2011.

JIA, Z. et al. EPR studies on the superoxide-scavenging capacity of the nutraceutical resveratrol. **Mol Cell Biochem**, v.313, n.1-2, Jun, p.187-94, 2008.

JIAO, L. et al. Selected polymorphisms of DNA repair genes and risk of pancreatic cancer. **Cancer Detect Prev**, v.30, n.3, p.284-91, 2006.

KANE, C. M. e LINN, S. Purification and characterization of an apurinic/aprimidinic endonuclease from HeLa cells. **J Biol Chem**, v.256, n.7, Apr 10, p.3405-14, 1981.

KASTENBAUER, S. e PFISTER, H. W. Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. **Brain**, v.126, n.Pt 5, May, p.1015-25. 2003.

KASTENBAUER, S. et al. Oxidative stress in bacterial meningitis in humans. **Neurology**, v.58, n.2, Jan 22, p.186-91, 2002.

KAWASE, M. et al. Reduction of apurinic/aprimidinic endonuclease expression after transient global cerebral ischemia in rats: implication of the failure of DNA repair in neuronal apoptosis. **Stroke**, v.30, n.2, Feb, p.441-8. 1999.

KIM, K. S. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. **Nat Rev Neurosci**, v.4, n.5, May, p.376-85, 2003.

KIM, Y. S. et al. Expression of proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in the brain during experimental group B streptococcal meningitis. **Brain Res Mol Brain Res**, v.128, n.1, Sep 10, p.95-102, 2004.

KLEIN, M. et al. Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy? **Prog Neurobiol**, v.80, n.6, Dec, p.269-80, 2006.

KOEDEL, U. e PFISTER, H. W. Oxidative stress in bacterial meningitis. **Brain Pathol**, v.9, n.1, Jan, p.57-67, 1999.

KOEDEL, U. et al. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. **Lancet Infect Dis**, v.2, n.12, Dec, p.721-36, 2002.

\_\_\_\_\_. Meningitis-associated central nervous system complications are mediated by the activation of poly(ADP-ribose) polymerase. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.22, n.1, Jan, p.39-49, 2002.

KORNELISSE, R. F. et al. Intrathecal production of interleukin-12 and gamma interferon in patients with bacterial meningitis. **Infect Immun**, v.65, n.3, Mar, p.877-81, 1997.

KRANTIC, S. et al. Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. **Prog Neurobiol**, v.81, n.3, Feb, p.179-96, 2007.

KUNINGER, D. T. et al. Human AP-endonuclease 1 and hnRNP-L interact with a nCaRE-like repressor element in the AP-endonuclease 1 promoter. **Nucleic Acids Res**, v.30, n.3, Feb 1, p.823-9, 2002.

KWIDZINSKI, E. et al. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. **Faseb J**, v.19, n.10, Aug, p.1347-9, 2005.

LANDO, D. et al. A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1alpha and the HIF-like factor. **J Biol Chem**, v.275, n.7, Feb 18, p.4618-27, 2000.

LAU, J. P. et al. Effects of gemcitabine on APE/ref-1 endonuclease activity in pancreatic cancer cells, and the therapeutic potential of antisense oligonucleotides.

**Br J Cancer**, v.91, n.6, Sep 13, p.1166-73, 2004.

LEACH, A. et al. Induction of immunologic memory in Gambian children by vaccination in infancy with a group A plus group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine. **J Infect Dis**, v.175, n.1, Jan, p.200-4, 1997.

LEE, H. M. et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 is a key modulator of keratinocyte inflammatory responses. **J Immunol**, v.183, n.10, Nov 15, p.6839-48, 2009.

LEIB, S. L. et al. Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. **Brain**, v.124, n.Pt 9, Sep, p.1734-42, 2001.

\_\_\_\_\_. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. **J Clin Invest**, v.98, n.11, Dec 1, p.2632-9, 1996.

\_\_\_\_\_. Neuroprotective effect of excitatory amino acid antagonist kynurenic acid in experimental bacterial meningitis. **J Infect Dis**, v.173, n.1, Jan, p.166-71, 1996.

LEIB, S. L. e TAUBER, M. G. Pathogenesis of bacterial meningitis. **Infect Dis Clin North Am**, v.13, n.3, Sep, p.527-48, v-vi, 1999.

LEPPERT, D. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. **Clin Infect Dis**, v.31, n.1, Jul, p.80-4, 2000.

LEWEN, A. et al. Oxidative cellular damage and the reduction of APE/Ref-1 expression after experimental traumatic brain injury. **Neurobiol Dis**, v.8, n.3, Jun, p.380-90, 2001.

LINDAHL, T. DNA repair enzymes. **Annu Rev Biochem**, v.51, p.61-87, 1982.

LINDAHL, T. e LJUNGQUIST, S. Apurinic and apyrimidinic sites in DNA. **Basic Life Sci**, v.5A, p.31-8, 1975.

LINDAHL, T. et al. DNA joining in mammalian cells. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v.58, p.619-24, 1993.

LIU, L. et al. Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer. **Clin Cancer Res**, v.8, n.9, Sep, p.2985-91, 2002.

LU, C. H. et al. The prognostic factors of adult tuberculous meningitis. **Infection**, v.29, n.6, Dec, p.299-304, 2001.

LUO, M. et al. Role of the multifunctional DNA repair and redox signaling protein Ape1/Ref-1 in cancer and endothelial cells: small-molecule inhibition of the redox function of Ape1. **Antioxid Redox Signal**, v.10, n.11, Nov, p.1853-67, 2008.

\_\_\_\_\_. Redox regulation of DNA repair: implications for human health and cancer therapeutic development. **Antioxid Redox Signal**, v.12, n.11, Jun 1, p.1247-69, 2010.

LUO, M. e KELLEY, M. R. Inhibition of the human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1) repair activity and sensitization of breast cancer cells to DNA alkylating agents with lucanthone. **Anticancer Res**, v.24, n.4, Jul-Aug, p.2127-34, 2004.

LUTZ, W. K. Endogenous genotoxic agents and processes as a basis of spontaneous carcinogenesis. **Mutat Res**, v.238, n.3, May, p.287-95, 1990.

MANTESE, O. C. et al. [Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of *Streptococcus pneumoniae*]. **J Pediatr** (Rio J), v.79, n.6, Nov-Dec, p.537-42, 2003.

MANVILLA, B. A. et al. NMR studies reveal an unexpected binding site for a redox inhibitor of AP endonuclease 1. **Biochemistry**, v.50, n.48, Dec 6, p.10540-9, 2011.

MARTINET, W. et al. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. **Circulation**, v.106, n.8, Aug 20, p.927-32, 2002.

MARCON, G. et al. APE1/Ref-1 in Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. **Neurosci Lett**, v.466, n.3, Dec 11, p.124-7. 2009.

MASTROIANNI, C. M. et al. Chemokine profiles in the cerebrospinal fluid (CSF) during the course of pyogenic and tuberculous meningitis. **Clin Exp Immunol**, v.114, n.2, Nov, p.210-4, 1998.

MATSUMOTO, Y. e KIM, K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. **Science**, v.269, n.5224, Aug 4, p.699-702, 1995.

MATSUMOTO, Y. et al. Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. **Mol Cell Biol**, v.14, n.9, Sep, p.6187-97, 1994.

MEDANA, I. M. et al. Metabolites of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in the cerebrospinal fluid of Malawian children with malaria. **J Infect Dis**, v.188, n.6, Sep 15, p.844-9, 2003.

MESSINA, M. et al. An overview of the health effects of isoflavones with an emphasis on prostate cancer risk and prostate-specific antigen levels. **J AOAC Int**, v.89, n.4, Jul-Aug, p.1121-34, 2006.

MILLER, N. J. e RICE-EVANS, C. A. Antioxidant activity of resveratrol in red wine. **Clin Chem**, v.41, n.12 Pt 1, Dec, p.1789, 1995.

MITOMO, K. et al. Two different cellular redox systems regulate the DNA-binding activity of the p50 subunit of NF-kappa B in vitro. **Gene**, v.145, n.2, Aug 5, p.197-203, 1994.

MOGENSEN, T. H. et al. Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. **J Leukoc Biol**, v.80, n.2, Aug, p.267-77, 2006.

MOOK-KANAMORI, D. O. et al. Fetal and infant growth and the risk of obesity during early childhood: the Generation R Study. **Eur J Endocrinol**, v.165, n.4, Oct, p.623-30. 2011.

MOLYNEUX, E. et al. Acute bacterial meningitis in children admitted to the Queen Elizabeth Central Hospital, Blantyre, Malawi in 1996-97. **Trop Med Int Health**, v.3, n.8, Aug, p.610-8, 1998.

MORAN, L. K. et al. Thiols in cellular redox signalling and control. **Curr Med Chem**, v.8, n.7, Jun, p.763-72, 2001.

MUNOZ, P. et al. Cryptococcal meningitis in a patient treated with infliximab. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.57, n.4, Apr, p.443-6, 2007.

MURRAY, C. J. e LOPEZ, A. D. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. **Science**, v.274, n.5288, Nov 1, p.740-3, 1996.

NAKAMURA, H. et al. Redox regulation of cellular activation. **Annu Rev Immunol**, v.15, p.351-69, 1997.

NAU, R.; EIFFERT, H. Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. **Clin Microbiol Ver**, vol.15, n.1, Jan, p. 95-110, 2002

NICHOLSON, S. K. et al. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. **Proc Nutr Soc**, v.67, n.1, Feb, p.42-7, 2008.

NISHI, T. et al. Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF-kappa B in vivo. **J Biol Chem**, v.277, n.46, Nov 15, p.44548-56, 2002.

O'HARA, A. M. et al. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha-induced IL-8 expression in gastric epithelial cells: role of reactive oxygen species and AP endonuclease-1/redox factor (Ref)-1. **Cytokine**, v.46, n.3, Jun, p.359-69, 2009.

\_\_\_\_\_. Interleukin-8 induction by Helicobacter pylori in gastric epithelial cells is dependent on apurinic/apyrimidinic endonuclease-1/redox factor-1. **J Immunol**, v.177, n.11, Dec 1, p.7990-9, 2006.

OHGA, S. et al. Cerebrospinal fluid concentrations of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha, and interferon gamma in bacterial meningitis. **Arch Dis Child**, v.70, n.2, Feb, p.123-5, 1994.

OKAZAKI, T. et al. A redox factor protein, ref1, is involved in negative gene regulation by extracellular calcium. **J Biol Chem**, v.269, n.45, Nov 11, p.27855-62, 1994.

ONO, Y. et al. Stable expression in rat glioma cells of sense and antisense nucleic acids to a human multifunctional DNA repair enzyme, APEX nuclease. **Mutat Res**, v.315, n.1, Jul, p.55-63, 1994.

ORIHUELA, C. J. et al. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. **J Infect Dis**, v.190, n.9, Nov 1, p.1661-9, 2004.

OSTERGAARD, C. e BENFIELD, T. Macrophage migration inhibitory factor in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system infection. **Crit Care**, v.13, n.3, p.R101, 2009.

PACE, D. e POLLARD, A. J. Meningococcal A, C, Y and W-135 polysaccharide-protein conjugate vaccines. **Arch Dis Child**, v.92, n.10, Oct, p.909-15, 2007.

PAGUIRIGAN, A. M. et al. Cytokine-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase induction in response to Chlamydia infection in human macrophage cultures. **Infect Immun**, v.62, n.4, Apr, p.1131-6, 1994.

PARIS, M. M. et al. The effect of interleukin-10 on meningeal inflammation in experimental bacterial meningitis. **J Infect Dis**, v.176, n.5, Nov, p.1239-46, 1997.

PARILDAR-KARPUZOĞLU, H. et al. Single nucleotide polymorphisms in base-excision repair genes hOGG1, APE1 and XRCC1 do not alter risk of Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v.442, n.3, p. 287-291, 2008.

PERECIN, G. e BERTOLOZZI, M. Meningites na Regional de Saúde de Piracicaba - 1992 a 2001: impacto da introdução da vacina contra o Haemophilus influenzae tipo b. **Bepa**, v.1, n.(5), 2004.

PERILLO, B. et al. DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression. **Science**, v.319, n.5860, Jan 11, p.202-6, 2008.

PFISTER, H. W. e SCHELD, W. M. Brain injury in bacterial meningitis: therapeutic implications. **Curr Opin Neurol**, v.10, n.3, Jun, p.254-9, 1997.

PIERSEN, C. E. et al. Evidence for an imino intermediate in the DNA polymerase beta deoxyribose phosphate excision reaction. **J Biol Chem**, v.271, n.30, Jul 26, p.17811-5, 1996.

PIZZA, M. et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v.287, n.5459, Mar 10, p.1816-20, 2000.

POULSEN, H. E. et al. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **Eur J Cancer Prev**, v.7, n.1, Feb, p.9-16, 1998.

PRATICO, D. Peripheral biomarkers of oxidative damage in Alzheimer's disease: the road ahead. **Neurobiol Aging**, v.26, n.5, May, p.581-3, 2005.

PRICE, A. A. Meningococcal vaccines. **Curr Pharm Des**, v.13, n.19, p.2009-14, 2007.

PUCCETTI, P. e GROHMANN, U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. **Nat Rev Immunol**, v.7, n.10, Oct, p.817-23, 2007.

RADIN, J. N. et al. beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v.73, n.12, Dec, p.7827-35, 2005.

RAFFOUL, J. J. et al. Down-regulation of apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox factor-1 expression by soy isoflavones enhances prostate cancer radiotherapy in vitro and in vivo. **Cancer Res**, v.67, n.5, Mar 1, p.2141-9, 2007.

REDMOND, A. et al. Fungal infections of the central nervous system: A review of fungal pathogens and treatment. **Neurol India**, v.55, n.3, July-September, p.251-259, 2007.

RIBES, S. et al. Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated *Streptococcus pneumoniae* by murine microglia. **Infect Immun**, v.78, n.2, Feb, p.865-71, 2010.

RICHARDSON, M. P. et al. Hearing loss during bacterial meningitis. **Arch Dis Child**, v.76, n.2, Feb, p.134-8. 1997.

RINNE, M. et al. Transient adenoviral N-methylpurine DNA glycosylase overexpression imparts chemotherapeutic sensitivity to human breast cancer cells. **Mol Cancer Ther**, v.3, n.8, Aug, p.955-67, 2004.

ROBERTSON, K. A. et al. Altered expression of Ape1/ref-1 in germ cell tumors and overexpression in NT2 cells confers resistance to bleomycin and radiation. **Cancer Res**, v.61, n.5, Mar 1, p.2220-5, 2001.

ROBSON, C. N. e HICKSON, I. D. Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/aprimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in E. coli xth (exonuclease III) mutants. **Nucleic Acids Res**, v.19, n.20, Oct 25, p.5519-23, 1991.

ROMAN, J. et al. Lipopolysaccharide induces expression of fibronectin alpha 5 beta 1-integrin receptors in human monocytic cells in a protein kinase C-dependent fashion. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.287, n.1, Jul, p.L239-49, 2004.

SAIKO, P. et al. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **Mutat Res**, v.658, n.1-2, Jan-Feb, p.68-94, 2008.

SCHELD, W. M. et al. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury. **J Infect Dis**, v.186 Suppl 2, Dec 1, p.S225-33, 2002.

SCHUCHAT, A. et al. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. **N Engl J Med**, v.337, n.14, Oct 2, p.970-6, 1997.

SCHUT, E. S. et al. Community-acquired bacterial meningitis in adults. **Pract Neurol**, v.8, n.1, Feb, p.8-23, 2008.

SCOVILLE, W. B. e MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v.12, n.1, Winter, p.103-13, 2000.

SENGUPTA, S. et al. Human AP endonuclease (APE1/Ref-1) and its acetylation regulate YB-1-p300 recruitment and RNA polymerase II loading in the drug-induced activation of multidrug resistance gene MDR1. **Oncogene**, v.30, n.4, Jan 27, p.482-93, 2011.

SHARIEF, M. K. et al. Blood-brain barrier damage in patients with bacterial meningitis: association with tumor necrosis factor-alpha but not interleukin-1 beta. **J Infect Dis**, v.166, n.2, Aug, p.350-8, 1992.

SILVA, W. A. et al. Epidemiological profile of acute bacterial meningitis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.43, n.4, Jul-Aug, p.455-7, 2010.

SJOLINDER, H. et al. Important role for Toll-like receptor 9 in host defense against meningococcal sepsis. **Infect Immun**, v.76, n.11, Nov, p.5421-8, 2008.

SONG, J. D. et al. Redox factor-1 mediates NF-kappaB nuclear translocation for LPS-induced iNOS expression in murine macrophage cell line RAW 264.7. **Immunology**, v.124, n.1, May, p.58-67, 2008.

SPRENGER, H. et al. Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. **Clin Immunol Immunopathol**, v.80, n.2, Aug, p.155-61, 1996.

SRIVASTAVA, D. K. et al. Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. **J Biol Chem**, v.273, n.33, Aug 14, p.21203-9, 1998.

STEPHENS, D. S. et al. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and Neisseria meningitidis. **Lancet**, v.369, n.9580, Jun 30, p.2196-210, 2007.

STONE, T. W. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. **Pharmacol Rev**, v.45, n.3, Sep, p.309-79, 1993.

STONE, T. W. e DARLINGTON, L. G. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. **Nat Rev Drug Discov**, v.1, n.8, Aug, p.609-20, 2002.

STOY, N. et al. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. **J Neurochem**, v.93, n.3, May, p.611-23, 2005.

SULTANA, R. et al. Synthetic lethal targeting of DNA double-strand break repair deficient cells by human apurinic/aprimidinic endonuclease inhibitors. **Int J Cancer**, v., Feb 29, 2012.

TAUBER, M. G. e MOSER, B. Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications. **Clin Infect Dis**, v.28, n.1, Jan, p.1-11; quiz 12, 1999.

TAVERNA, P. et al. Inhibition of base excision repair potentiates iododeoxyuridine-induced cytotoxicity and radiosensitization. **Cancer Res**, v.63, n.4, Feb 15, p.838-46, 2003.

\_\_\_\_\_. Methoxyamine potentiates DNA single strand breaks and double strand breaks induced by temozolomide in colon cancer cells. **Mutat Res**, v.485, n.4, May 10, p.269-81, 2001.

TAYSI, S. Oxidant/antioxidant status in liver tissue of vitamin B6 deficient rats. **Clin Nutr**, v.24, n.3, Jun, p.385-9, 2005.

TELL, G. et al. Understanding different functions of mammalian AP endonuclease (APE1) as a promising tool for cancer treatment. **Cell Mol Life Sci**, v.67, p.3589–3608, 2010.

\_\_\_\_\_. The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon? **Antioxid Redox Signal**, v.7, n.3-4, Mar-Apr, p.367-84, 2005.

\_\_\_\_\_. Redox effector factor-1 regulates the activity of thyroid transcription factor 1 by controlling the redox state of the N transcriptional activation domain. **J Biol Chem**, v.277, n.17, Apr 26, p.14564-74, 2002.

TEYSSOU, R. e MUROS-LE ROUZIC, E. Meningitis epidemics in Africa: a brief overview. **Vaccine**, v.25 Suppl 1, Sep 3, p.A3-7, 2007.

THOMAS, D. et al. Inactivation of OGG1 increases the incidence of G . C-->T . A transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. **Mol Gen Genet**, v.254, n.2, Mar 26, p.171-8, 1997.

TOM, S. et al. Regulatory roles of p21 and apurinic/aprimidinic endonuclease 1 in base excision repair. **J Biol Chem**, v.276, n.52, Dec 28, p.48781-9, 2001.

TOMASZ, A. et al. Insertional inactivation of the major autolysin gene of *Streptococcus pneumoniae*. **J Bacteriol**, v.170, n.12, Dec, p.5931-4, 1988.

TSUKAHARA, H. et al. Oxidative stress in childhood meningitis: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentration in cerebrospinal fluid. **Redox Rep**, v.5, n.5, p.295-8, 2000.

TUOMANEN, E. et al. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. **J Infect Dis**, v.151, n.5, May, p.859-68, 1985.

UENO, M. et al. Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. **J Biol Chem**, v.274, n.50, Dec 10, p.35809-15, 1999.

VAN DE BEEK, D. et al. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. **N Engl J Med**, v.351, n.18, Oct 28, p.1849-59. 2004.

VAN DEUREN, M. et al. The pattern of interleukin-1beta (IL-1beta) and its modulating agents IL-1 receptor antagonist and IL-1 soluble receptor type II in acute meningococcal infections. **Blood**, v.90, n.3, Aug 1, p.1101-8, 1997.

VAN ESSEN, D. et al. A feed-forward circuit controlling inducible NF-kappaB target gene activation by promoter histone demethylation. **Mol Cell**, v.39, n.5, Sep 10, p.750-60. 2010.

VAN FURTH, A. M. et al. Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy. **Infect Immun**, v.64, n.12, Dec, p.4883-90, 1996.

\_\_\_\_\_. Levels of nitric oxide correlate with high levels of tumor necrosis factor alpha in cerebrospinal fluid samples from children with bacterial meningitis. **Clin Infect Dis**, v.22, n.5, May, p.876-8, 1996.

VASCOTTO, C. et al. Genome-wide analysis and proteomic studies reveal APE1/Ref-1 multifunctional role in mammalian cells. **Proteomics**, v.9, n.4, Feb, p.1058-74, 2009.

\_\_\_\_\_. APE1/Ref-1 interacts with NPM1 within nucleoli and plays a role in the rRNA quality control process. **Mol Cell Biol**, v.29, n.7, Apr, p.1834-54, 2009.

VASKO, M. R. et al. The multifunctional DNA repair/redox enzyme Ape1/Ref-1 promotes survival of neurons after oxidative stress. **DNA Repair** (Amst), v.4, n.3, Mar 2, p.367-79, 2005.

WAAGE, A. et al. Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. **J Exp Med**, v.170, n.6, Dec 1, p.1859-67, 1989.

WALKER, L. J. et al. Identification of residues in the human DNA repair enzyme HAP1 (Ref-1) that are essential for redox regulation of Jun DNA binding. **Mol Cell Biol**, v.13, n.9, Sep, p.5370-6, 1993.

WALTON, M. et al. Loss of Ref-1 protein expression precedes DNA fragmentation in apoptotic neurons. **Brain Res Mol Brain Res**, v.44, n.1, Feb, p.167-70. 1997.

WANG, D. et al. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. **Mol Cancer Ther**, v.3, n.6, Jun, p.679-86, 2004.

WARIS, G. e AHSAN, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. **J Carcinog**, v.5, p.14, 2006.

WEISFELT, M. et al. Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. **Lancet Neurol**, v.5, n.2, Feb, p.123-9. 2006.

WELLMAN, M. B. et al. Sensorineural hearing loss in postmeningitic children. **Otol Neurotol**, v.24, n.6, Nov, p.907-12. 2003.

WELLMER, A. et al. Spatial memory and learning deficits after experimental pneumococcal meningitis in mice. **Neurosci Lett**, v.296, n.2-3, Dec 22, p.137-40, 2000.

WIDNER, B. et al. Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. **J Neural Transm**, v.107, n.3, p.343-53, 2000.

\_\_\_\_\_. Interferon-gamma-induced tryptophan degradation: neuropsychiatric and immunological consequences. **Curr Drug Metab**, v.1, n.2, Sep, p.193-204, 2000.

WU, H. H. et al. Subcellular localization of apurinic endonuclease 1 promotes lung tumor aggressiveness via NF-kappaB activation. **Oncogene**, v.29, n.30, Jul 29, p.4330-40, 2010.

XANTHOUDAKIS, S. e CURRAN, T. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. **Embo J**, v.11, n.2, Feb, p.653-65, 1992.

\_\_\_\_\_. Redox regulation of AP-1: a link between transcription factor signaling and DNA repair. **Adv Exp Med Biol**, v.387, p.69-75, 1996.

XANTHOUDAKIS, S. et al. The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.1, Jan 4, p.23-7, 1994.

XU, Y. et al. The apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/ref-1) DNA repair enzyme is elevated in premalignant and malignant cervical cancer. **Anticancer Res**, v.17, n.5B, Sep-Oct, p.3713-19, 1997.

YAN, L. et al. Combined treatment with temozolomide and methoxyamine: blocking apurinic/pyrimidinic site repair coupled with targeting topoisomerase II $\alpha$ . **Clin Cancer Res**, v.13, n.5, Mar 1, p.1532-9, 2007.

YANG, S. et al. Alterations in the expression of the apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE/Ref-1) in human melanoma and identification of the therapeutic potential of resveratrol as an APE/Ref-1 inhibitor. **Mol Cancer Ther**, v.4, n.12, Dec, p.1923-35, 2005.

YOSHIDA, A. e UEDA, T. Human AP endonuclease possesses a significant activity as major 3'-5' exonuclease in human leukemia cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.310, n.2, Oct 17, p.522-8, 2003.

YU, W. et al. Evidence for the involvement of apoptosis-inducing factor-mediated caspase-independent neuronal death in Alzheimer disease. **Am J Pathol**, v.176, n.5, May, p. 2209-18, 2010.

ZANELLA, R. C. et al. Changes in serotype distribution of Haemophilus influenzae meningitis isolates identified through laboratory-based surveillance following routine childhood vaccination against H. influenzae type b in Brazil. **Vaccine**, v.29, n.48, Nov 8, p.8937-42. 2011.

ZHANG, Y. e BHAVNANI, B. R. Glutamate-induced apoptosis in neuronal cells is mediated via caspase-dependent and independent mechanisms involving calpain and caspase-3 proteases as well as apoptosis inducing factor (AIF) and this process is inhibited by equine estrogens. **BMC Neurosci**, v.15, n.7, Jun, 49, 2006.

ZHOU, H. et al. Nanog inhibits lipopolysaccharide-induced expression of pro-inflammatory cytokines by blocking NF-kappaB transcriptional activity in rat primary microglial cells. **Mol Med Report**, v.5, n.3, Mar, p.842-6, 2012.

ZIMMER, S. M. e STEPHENS, D. S. Serogroup B meningococcal vaccines. **Curr Opin Investig Drugs**, v.7, n.8, Aug, p.733-9, 2006.

ZOU, G. M. et al. Ape1 regulates hematopoietic differentiation of embryonic stem cells through its redox functional domain. **Blood**, v.109, n.5, Mar 1, p.1917-22, 2007.

ZOU, G. M. e MAITRA, A. Small-molecule inhibitor of the AP endonuclease 1/REF-1 E3330 inhibits pancreatic cancer cell growth and migration. **Mol Cancer Ther**, v.7, n.7, Jul, p.2012-21, 2008.

ZWIJNENBURG, P. J. et al. Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection. **J Infect Dis**, v.183, n.7, Apr 1, p.1143-6, 2001.

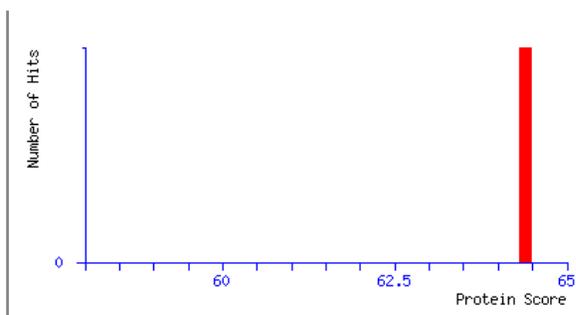
ZWIJNENBURG, P. J. et al. Interleukin-18 gene-deficient mice show enhanced defense and reduced inflammation during pneumococcal meningitis. **J Neuroimmunol**, v.138, p.31–37, 2003.

## 9.0 APÊNDICE

User : leonam  
 Email : leonam\_manoel@yahoo.com  
 Search title :  
 Database : SwissProt 2010\_09 (519348 sequences; 183273162 residues)  
 Taxonomy : Rattus (7552 sequences)  
 Timestamp : 19 Aug 2010 at 23:18:10 GMT  
 Top Score : 64 for **PSB2\_RAT**, Proteasome subunit beta type-2 OS=Rattus norvegicus GN=Psmb2  
 PE=1 SV=1

### Mascot Score Histogram

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Protein scores greater than 51 are significant ( $p < 0.05$ ).



| <a href="#">PSB2_RAT</a> Mass: 22898 Score: 64 Expect: 0.0027 Matches: 5 |           |           |         |       |     |       |               |
|--|-----------|-----------|---------|-------|-----|-------|---------------|
| Proteasome subunit beta type-2 OS=Rattus norvegicus GN=Psmb2 PE=1 SV=1   |           |           |         |       |     |       |               |
| Observed   | Mr(expt)  | Mr(calc)  | Delta   | Start | End | Miss  | Peptide       |
| 861.4780   | 860.4707  | 861.4266  | -0.9559 | 163   | -   | 169 0 | K.CLEELQK.R   |
| 900.9880   | 899.9807  | 899.4245  | 0.5563  | 35    | -   | 41 1  | K.MFKMSEK.I   |
| 1034.4660  | 1033.4587 | 1034.4491 | -0.9904 | 30    | -   | 37 1  | K.DDHDKMFK.M  |
| 1050.4630  | 1049.4557 | 1050.5644 | -1.1087 | 63    | -   | 70 1  | K.NVQLYKMR.N  |
| 1113.8630  | 1112.8557 | 1112.6665 | 0.1892  | 154   | -   | 162 2 | R.ERAVELLRK.C |

## 10.0 ANEXO

## 10.1 Artigo Aceito

Mutation Research 713 (2011) 39–47



Contents lists available at ScienceDirect

Mutation Research/Fundamental and Molecular  
Mechanisms of Mutagenesisjournal homepage: [www.elsevier.com/locate/molmut](http://www.elsevier.com/locate/molmut)  
Community address: [www.elsevier.com/locate/mutres](http://www.elsevier.com/locate/mutres)

## SNPs in DNA repair genes associated to meningitis and host immune response

Thayse Azevedo da Silva<sup>a</sup>, Fabrícia Lima Fontes<sup>a</sup>, Leonam Gomes Coutinho<sup>a</sup>,  
Fladjule Rejane Soares de Souza<sup>a</sup>, Julliane Tamara Araújo de Melo<sup>a</sup>, Janeusa Trindade de Souto<sup>b</sup>,  
Stephen L. Leib<sup>c</sup>, Lucymara Fassarella Agnez-Lima<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Av. Salgado Filho s/n, 59072-970 Natal, RN, Brazil<sup>b</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brazil<sup>c</sup> Institute for Infectious Diseases, University of Bern, Friedbuehlstrasse 51, CH-3010 Bern, Switzerland

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 March 2011

Received in revised form 11 May 2011

Accepted 20 May 2011

Available online 27 May 2011

## Keywords:

Base excision repair

Polymorphism

Meningitis

Inflammatory response

## ABSTRACT

*In vitro* and in animal models, APE1, OGG1, and PARP-1 have been proposed as being involved with inflammatory response. In this work, we have investigated if the SNPs APE1 Asn148Glu, OGG1 Ser326Cys, and PARP-1 Val762Ala are associated to meningitis. The patient genotypes were investigated by PIRA-PCR or PCR-RFLP. DNA damages were detected in genomic DNA by Fpg treatment. IgG and IgA were measured from plasma and the cytokines and chemokines were measured from cerebrospinal fluid samples using Bio-Plex assays. A higher frequency ( $P < 0.05$ ) of APE1 Glu allele in bacterial meningitis (BM) and aseptic meningitis (AM) patients was observed. The genotypes Asn/Asn in control group and Asn/Glu in BM group was also higher. For the SNP OGG1 Ser326Cys, the genotype Cys/Cys was more frequent ( $P < 0.05$ ) in BM group. The frequency of PARP-1 Val/Val genotype was higher in control group ( $P < 0.05$ ). The occurrence of combined SNPs is significantly higher in BM patients, indicating that these SNPs may be associated to the disease. Increasing in sensitive sites to Fpg was observed in carriers of APE1 Glu allele or OGG1 Cys allele, suggesting that SNPs affect DNA repair activity. Alterations in IgG production were observed in the presence of SNPs APE1 Asn148Glu, OGG1 Ser326Cys or PARP-1 Val762Ala. Moreover, reduction in the levels of IL-6, IL-1Ra, MCP-1/CCL2 and IL-8/CXCL8 was observed in the presence of APE1 Glu allele in BM patients. In conclusion, we obtained indications of an effect of SNPs in DNA repair genes on the regulation of immune response in meningitis.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 10.2 Artigo Submetido

### **Cerebrospinal-fluid cytokine and chemokine profile in patients with pneumococcal and meningococcal meningitis**

L. G. Coutinho<sup>1</sup>, D. Grandgirard<sup>2</sup>, S. L. Leib<sup>2</sup>, L. F. Agnez-Lima<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brazil

<sup>2</sup>Institute for Infectious Diseases, University of Bern, Friedbuehlstrasse 51, CH-3010 Bern, Switzerland

#### **\*Corresponding author:**

**Dr. Lucymara Fassarella Agnez-Lima**

Departamento de. Biologia Celular e Genética. CB – UFRN

Campus Universitário, Lagoa Nova

Natal, CP 1575, 59078-970, RN, Brazil

Tel.# 55.84.3211-9209; Fax# 55.84. 3215-3346

E-mail: [lfagnez@ufrnet.br](mailto:lfagnez@ufrnet.br)

## Abstract

**Background:** Bacterial meningitis is characterized by an intense inflammatory reaction contributing to neuronal damage. The aim of this study was to obtain a comparative analysis of cytokines and chemokines in patients with pneumococcal and meningococcal meningitis considering that a clear difference between the immune response induced by these pathogens remains unclear. **Methods:** The concentration in cerebrospinal fluid (CSF) of the cyto/chemokines, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1Ra, CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CLL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  and G-CSF, was measured from CSF of patients with pneumococcal and meningococcal meningitis and compared with peer-reviewed studies from literature. **Results:** Concerning cytokines levels, only IFN- $\gamma$  was significantly higher in patients with *Streptococcus pneumoniae* compared to those with *Neisseria meningitidis*. The index of release of cyto/chemokines per cell was significantly higher in pneumococcal meningitis. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 were the immune modulators more described in the literature, while cytokines, IL-2, IL-1Ra, G-CSF and CCL4/MIP-1 $\beta$  were not found. However, when patients with LP within 48h from the initial symptoms were compared, TNF- $\alpha$  was significantly higher in meningococcal meningitis. **Conclusion:** Data obtained in this study and compared with the other reported research showed a similar profile of cytokines among pathogens, however elevated levels of IFN- $\gamma$  and the ability to release cytokines with a low number of cells are important factors to be considered in the pathogenesis of pneumococcal meningitis, although these observed differences are not a sufficient condition to alter the current corticosteroid therapy when meningitis is induced from both pathogens.

**Keywords:** pneumococcal meningitis; meningococcal meningitis; cytokines; chemokines; interferon gamma; cerebrospinal fluid

## Background

Bacterial meningitis (BM) is an infectious disease characterized by high mortality and morbidity rates [1]. After *Haemophilus influenzae* type b immunization, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* have become the two main causes of BM in Brazil [2-4].

The inflammatory response plays a primordial role in the pathogenesis of cerebral injury associated to different meningitis etiologies [5, 6]. During BM, bacterial cell-wall components, such as lipopolysaccharide from gram-negative bacteria and lipoteichoic acid from gram-positive bacteria, trigger the massive release of proinflammatory molecules. These in turn increase the permeability of the blood-brain barrier (BBB) and attract leukocytes to the central nervous system (CNS) (pleocytosis). Cytokines, reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and matrix metalloproteinases, act in a coordinated manner to promote an oxidative burst leading to energy failure and cell death [7-10]. The pattern of inflammatory mediators present in the cerebrospinal fluid (CSF) in response to an immune assault determines the disease's severity and its sequelae [7, 11].

BM has often been comprised in a unique group, considering that gram-positive and gram-negative bacteria compounds trigger the same Toll-like receptors (TLR). However, *S. pneumoniae* and *N. meningitidis* also seem to modulate different Toll-like receptors that consequently regulate a different expression of cytokines. TLR2, TLR4, and TLR9 are important in the response against *S. pneumoniae*, while TLR2 does not seem to be essential in the host response to *N. meningitidis* [12-15]. Conversely, important mediators of chemoattraction, such as CXCL8/IL-8, CCL3/MIP-1 $\alpha$  and CCL2/MCP-1, induce a similar intensity of response in relation to *S. pneumoniae* and *N. meningitidis* [16, 17].

Although isolated studies have demonstrated higher cytokine expression during BM caused by different agents, they are limited in establishing differences between the inflammatory response induced by each pathogen. Relevant questions, such as “are there differences between the inflammatory responses caused by different etiologic agents of BM?” remain to be answered. This comparative study is important because BM continues to have a high occurrence and the outcome from pneumococcal meningitis (PM) differs from that of meningococcal meningitis (MM) [18, 19].

Currently, the BM treatment is similar for both etiological agents, i.e. antibiotics and corticosteroids. Dexamethasone remains as the antiinflammatory therapy most used during BM treatment. Clinical trials have shown reduction in unfavorable outcome, such as lower mortality in adults and fewer neurological and auditory sequelae in adults and children during PM, however similar beneficial effect was not seen for dexamethasone during MM [20]. Thus, if there is a marked difference in inflammatory profile, this may have implication for immunomodulatory therapies, which should be tailored differently for either etiology.

In this work, we measured twelve cyto/chemokines that are commonly expressed during BM in the CSF from patients with PM and MM and compared with individual studies of cyto/chemokine determination from literature in order to obtain further knowledge about the inflammatory profile in BM caused by meningococci and pneumococci. Since the inflammatory response has been associated to the sequelae occurrence after the disease, a better understanding of the pathophysiologic mechanisms between the host and each causative agent may contribute to designing new therapies for the reduction of death and sequelae caused by this severe disease.

## **Methods**

### **Case selection and sample collection**

Twenty-eight patients who were admitted to the Hospital Giselda Trigueiro (Natal, Brazil) with a suspicion of meningitis were enrolled in this study. This study was evaluated and approved by the Committee on Medical Ethics of the Giselda Trigueiro Hospital and by the National Committee on Ethics (CONEP) with number 0052.1.051.000-05. Informed consent was obtained from each patient participating in this study.

CSF samples were collected by lumbar puncture (LP) during standard routine for diagnosis of meningitis in the Hospital Giselda Trigueiro. The routine diagnosis includes: evaluation of clinical symptoms, detection of the pathogen in the CSF by Gram staining, positive bacterial culture, number of erythrocytes, white blood cell count (WBC) with detection of levels of polymorphonuclear granulocytes (PMN) and protein and glucose contents. Patients who had been treated with antibiotics before LP or with other diseases (such as AIDS) that affect the immune and inflammatory responses (e.g. the cytokines expression) were not included in this study. The CSF samples were collected from the initial LP at the time of admission to hospital. All samples were kept at 4°C after LP and centrifuged (3000 g, 5 min, 4°C). Supernatants were frozen and stored at -80°C until assayed. CSF was assigned a code for anonymization purpose and the study was carried out according to ethical regulations.

### **Measurement of cyto/chemokine concentration**

CSF cyto/chemokines levels were measured by a Bio-Plex 200 suspension array system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using microsphere-based multiplex assays. In the assay, the

concentration of 12 cyto/chemokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1Ra, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL2/MCP-1, G-CSF, CXCL8/IL-8 and IL-2) was assessed in 28 CSF samples, using the human cytokine *Lincoplex* Kit (HCYTO-60k, Lincoplex®, Linco Research Inc., St Charles, MA, USA). Samples (25 $\mu$ l) were measured undiluted and in duplicate. The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Samples were diluted to fit in the dynamic range of the assay when appropriate. Cyto/chemokine concentrations were calculated by Bio-Plex Manager software using a 5-parametric logistic standard curve derived from the recombinant cytokine standards provided in the kit.

For statistical analysis, samples with cyto/chemokine levels below or above the detection limits were arbitrarily assigned the values corresponding to the minimum (3.2 pg/ml) or maximum (10,000 pg/ml) limits respectively, spanning the dynamic range of the assay, and following the manufacturer's instructions.

### **Data sources**

Peer-reviewed articles were searched using the Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (National Library of Medicine, Bethesda, Maryland) and Web of Science (Thomson Reuters, New York, NY) until December of 2010, using the key words *Bacterial Meningitis plus cytokine plus patient*. Additionally, words such as interferon, interleukin, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1Ra, CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  and G-CSF were identified in the retrieved articles, and reference lists of relevant studies were searched for any additional information.

### **Study selection and data extraction**

Original studies measuring cyto/chemokine concentrations in the CSF of living subjects diagnosed with PM and MM were included. The inclusion criteria required was the presence of the pathogen in the CSF culture or antigen agglutination tests on CSF. Studies measuring cyto/chemokine concentrations from CSF following stimulation and other diseases which can disturb the immune response were excluded to avoid bias associated with the immune challenge. The results of each relevant article were critically analyzed and data of mean, median, standard deviation (SD), standard error (SE), confidence interval (CI) and percentage of each cyto/chemokine concentration for PM and MM were extracted. Studies with qualitative results such as western blot or protein array test were not included.

### **Statistical analysis**

Data were analyzed using Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) and tested for normality using Kolmogorov-Smirnov normality test. Almost all the variables did not fit to normal distribution and were analyzed with non-parametric methods. Differences between groups were analyzed using the one-way ANOVA non-parametric *Kruskal-Wallis test*. Data are expressed as median and (25; 75 percentiles). Pair-wise analysis between two groups was performed using the Mann Whitney test. For all the statistical tests, values of  $P < 0.05$  were considered significant.

## Results

### CSF samples and cyto/chemokine measurement

In our work, *S. pneumoniae* was diagnosed in sixteen patients and *N. meningitidis* in twelve. At the time of diagnosis five patients with BM due to *S. Pneumoniae* reported that had been sick for 12–48 hours, and eleven had been sick for >2 days. Fever, headache, neck stiffness were present in all patients during clinical diagnosis. PM was associated with brain abscess (n=3), CSF fistula (n=2), acute otitis media (n=1). Out of 16 patients with PM two died and 14 were cured after standard therapy. Four patients with MM had been sick for <12 hours, one had been sick for 12–48 hours, and seven had been sick for >2 days. As observed for PM, almost all patients with MM presented fever, headache, neck stiffness, mental confusion and petechias. MM was associated with meningococemia (n=4). Patients with MM included in this study were cured. Overall, the majority of patients in the study were adult. Only six patients under 18 years old were included in PM and four in MM groups. CSF biochemical parameters of each causative agent, including the number of leucocytes, protein, and glucose content results, are presented in Table 1.

The comparison of the concentration of cyto/chemokines in CSF samples is shown in Fig.1. Significant differences in the levels of cyto/chemokines between PM and MM groups were not observed, except for IFN- $\gamma$ . Elevated level of IFN- $\gamma$  in the patients with PM (median 237.2 pg/mL, range 34.5-624.7 pg/mL;  $P<0.05$  ) compared to MM with median (10.33 pg/mL, range 3.5-41.1 pg/mL) was observed. Although not statistically significant, an increased level of IL-2 was also observed in patients with PM (median 3.2 pg/mL, range 3.2-22.8 pg/mL;  $P=0.08$ ) compared to MM (median 3.2 pg/mL, range 3.2-3.2 pg/mL). Other immune modulators, not

identified or poorly identified in prior reports, such as IL-10, IL-1Ra, CCL4/MIP-1 $\beta$  e G-CSF, were measured and no significant difference was observed between the pathogens.

Comparative analyses of cytokines levels considering time of symptoms prior to LP were performed. Patients with LP within 48h from the initial symptoms were compared to patients with LP after 48h. First, individuals with meningitis from each pathogen were separately compared among them. Patients with PM had elevated levels of IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\beta$  and G-CSF in the group with LP within 48h from the initial symptoms. On the other hand, MM patients with LP within 48h showed higher levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  and G-CSF in comparison to patients with LP after 48h (data not shown). Further, individuals with LP within 48h from the initial symptoms were compared between PM and MM. Higher levels of IFN- $\gamma$  was observed in patients with PM (median 521.7 pg/mL, range 311.2-1353 pg/mL;  $P < 0.01$ ) compared to NM (median 33.45 pg/mL, range 7.4-92.6 pg/mL) while TNF- $\alpha$  was significantly higher in the CSF of patients with MM (median 2549 pg/mL, range 1047-6513 pg/mL;  $P < 0.05$ ) compared to patients with PM (median 340.4 pg/mL, range 241.5-895.5 pg/mL) (Fig.2). While PM patients with LP after 48h showed significant higher levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  compared to NM patients (Fig.3). In addition, cytokine levels were compared according to different ages but they were not statistically significant.

### **Ratio between cyto/chemokine concentration and number of cell in CSF (strength of cyto/chemokine release index)**

Cyto/chemokine concentrations were individually categorized by the number of cells in CSF to determine a cyto/chemokine release index. This index was indirectly used to compare the strength of activation of the immune response and the release of cyto/chemokine promoted for

each pathogen. In order to avoid the interference of cyto/chemokines originated from the blood as result of the blood brain barrier, CSF cyto/chemokine levels were firstly divided through the CSF protein level and then divided by the number of cells to correct the BBB disturbance. The data demonstrated a higher cyto/chemokine/cell number ratio during PM (Fig. 4). As observed, PM is characterized by a significant release of chemokines, growth factors and anti inflammatory cytokines. Significant *P* values are shown in the Fig. 4.

### **Comparative of literature findings and cyto/chemokine concentration**

A total of 282 records of cyto/chemokine studies during BM were retrieved from the literature search. Out of 282, only 7 were included in the search criteria of this study (Table 2). Notably, selected reports showed the concentration of TNF- $\alpha$  comprises 6/7 studies, following IL-6, IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  with 2/7 studies, and only 1/7 of the retrieved reports measured the concentration of IL-10, IL-1Ra, CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1 and CCL3/MIP-1 $\alpha$ . Reports showing the concentration of IL-2, IL-1Ra, CCL4/MIP-1 $\beta$  and G-CSF in CSF of human patients during PM or MM were not observed in this literature screening. TNF- $\alpha$  showed a contradictory result in the different studies, 2/6 of them demonstrated elevated levels of TNF- $\alpha$  during meningitis caused by *S. pneumoniae*, while 4/6 demonstrated the highest levels during NM [17, 21-26]. In the two reports that IFN- $\gamma$  was measured, the values were significantly higher in meningitis caused by *S. pneumoniae* than by *N. meningitides* [23, 25]. Mastroianni *et al.* [17] observed similar levels of CXCL8/IL-8 and CCL3/MIP-1 $\alpha$  in meningitis caused by both studied pathogens, although CCL2/MCP-1 was higher in patients with NM. The cytokine IL-6 levels were observed in two studies, but they were controversial and not conclusive, due to the small number of patients included in each study [21, 24].

Almost all studies showed elevated cyto/chemokine concentrations in BM patients when compared with healthy subjects. The works included a variety of patients of different ages: 4/7 studies showed cytokines levels in infants, children and adolescents [21, 23-25], while 2/7 included only adult patients [22, 26] and 1/7 studies included both children and adults [17]. The amount of patients included in each study was distinct, in 4 of 7 studies the range was 1 to 12 individuals for both pathogens [17, 23, 26], while 3/7 had from 19 to 28 individual for both pathogens [17, 18, 21]. Only one study described the presence of neurological sequelae, including hearing loss and cerebral atrophy, relating to the pathogen [25]. Data of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1 and CCL3/MIP-1 $\alpha$  concentrations were measured from CSF patients using only two types of techniques, ELISA (5/7) and immunoradiometric assays (2/7).

## **Discussion**

Different experimental approaches have been used to analyze the expression levels of the immune modulators, such as microarray and ELISA assays. In general, studies have mainly focused on the comparison of BM and meningitis caused by other infectious agents such as viruses and fungi, using healthy individuals as control [27-30]. However, comparison of expression levels of cytokines between the two main causative agents of human BM, *S. pneumoniae* and *N. meningitidis*, have been poorly evaluated so far. The literature screening revealed the need of more comparative studies, in particular for cyto/chemokines poorly studied in BM patients, such as IL-10, CXCL8/IL-8, CCL3/MIP-1 $\alpha$  and CCL2/MCP-1. To our knowledge, this work is the first to assess the levels of cytokines IL-2, IL-1Ra, CCL4/MIP-1 $\beta$  and G-CSF in patients with PM and MM. In contrast, some cytokines have been well

characterized in BM such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6, which have received more attention in the majority of the studies. In general, a limited profile of cytokine expression from the two major meningitis-pathogens was observed in each study. The use of the multiplex method in our work allowed the comparison between patients with PM and MN with a broader spectrum of cytokines analyzed simultaneously.

In all analyzed studies, including ours, some limitations are observed. These would be the small number of patients and a lack of correlation between cytokines levels and symptoms of the disease and its sequelae after treatment, which may be related to some peculiarities of BM. Collection of CSF is an invasive procedure, therefore obtaining the samples is usually associated with routine diagnosis of the disease, which generally only occurs in emergency situations. In addition, poor hospital conditions in the public health system of developing countries, where BM cases occur more frequently, make it difficult access to patients' clinical data.

In Table 2, we showed that TNF- $\alpha$  has been studied quite frequently. This cytokine has been identified as a useful complementary tool to improve the diagnosis of meningitis, especially in cases where the CSF examination is inconclusive. Although this cytokine seems to be important in driving several mechanisms underlying the immune response, our experimental data and the literature screening showed that this cytokine is not differentially expressed during meningitis caused by *S. pneumoniae* or *N. meningitidis*. On the other hand, after to consider patients with LP within 48h from the initial symptoms, TNF- $\alpha$  was seen significantly elevated in the CSF of MM patients, but the same result did not repeat when LP is performed after 48h. This data suggest a rapid decline of TNF- $\alpha$  during MM. Studies reported here showed elevated levels of median for the TNF- $\alpha$  as presented in Table 2, even though the authors concluded that there was no difference of pathogen-dependent in the CSF [22, 24, 27].

The IL-6 levels are also elevated during BM and some researchers have tried to associate this with TNF- $\alpha$  for the differential diagnosis of BM, but without success until now. Dulkerian *et al.* [21] and Mukai *et al.* [24] observed high levels of IL-6 during BM without differences between PM and MM. Other cytokines or chemokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-10, CXCL8/IL-8, CCL3/MIP-1 $\alpha$  and CCL2/MCP-1 did not demonstrate any significant difference between pathogens [17, 23, 26, 27]. Corroborating with this, our measurements also did not differ between pathogens for these cytokines.

It is plausible that additional factors can lead to differences in the cytokine expression, such as the type of the pathogen strain, the host's age and the time of the LP after infection as it was seen in our data. Strains of *N. meningitidis* seem to be able to induce different cytokine profiles [31, 32]. Considering the age of the patients, Sharief *et al.* [26] observed that concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in CSF of patients with bacterial meningitis were not age-dependent. Additionally, Dulkerian *et al.* [21] demonstrates that neonates and young infants respond to pathogen invasion with the release of cytokines at comparable levels to those found in older children and adolescents. Similarly in our study, age-related differences were not observed (data not shown).

IFN- $\gamma$  was the unique protein that showed higher concentration in patients with PM compared with MM independent on the time of the LP. Kornelisse *et al.* [23] observed that IFN- $\gamma$  was significantly higher in patients with PM than in children with meningitis caused by *H. influenza* or *N. meningitidis* and obtained data suggesting that the production of IFN- $\gamma$  in the CSF from patients with bacterial meningitis is induced by IL-12, with TNF- $\alpha$  as a co-stimulator. The high IFN- $\gamma$  production in monocytes culture seems to be mainly attributed to Gram-positive bacteria, which induce much more IL-12 than Gram-negative bacteria [33].

IFN- $\gamma$  is involved in the stimulation of non-specific defense mechanisms of macrophages and polymorphonuclear leukocytes, such as phagocytosis and secretion of reactive oxygen intermediates [34]. Furthermore, our data also showed that IL-2 seems to be more pronounced in PM than in MM. The highest expression of IFN- $\gamma$  and IL-2 during PM suggests the occurrence of a Th1 immune response [35]. In fact, TH1 and TH17 response were observed in a co-culture model of human monocytes and CD4<sup>+</sup>T cells stimulated with *S. pneumoniae* [36].

The difference in the degree of immune response observed during pneumococcal infection may be related to the best or worst outcome of the disease [37]. A deeper understanding of the immune response pathways against each pathogen, such as the type of Th response, can help to develop adjunctive immunotherapy using Th-polarized cytokines to increase host defense and accelerate healing of the pathogen.

Patients with PM, even with significantly lower numbers of WBC as demonstrated in Table 1, possess cyto/chemokines concentration at the same levels of patients with MM. Normalized concentrations of inflammatory mediators by cell count suggest a higher degree of activation on a cellular level, mainly during meningitis caused by *S. pneumoniae* (Fig. 4). The difference in the IFN- $\gamma$  concentration can be reflected in the potential of cells to release inflammatory cytokines, or this mediator can work as a signal to regulate invading leukocytes during BM [38].

The high immunogenicity of *S. pneumoniae* caused by cell components, e.g., pneumolysin, lipoteichoic acid and nucleic acids, can be responsible to release an elevated amount of cytokines per cell number [39, 40]. Moreover, anti-inflammatory cytokines such as, IL-1Ra and IL-10 demonstrated the highest values to this index of cell activation. These inflammatory modulators could be blocking the recruitment of other cells. Although IL-8 and

MCP-1 are important to attract phagocytic cells and have been detected at similar levels in both pathogens, the number of cells was significantly higher during MM than PM. Some studies have shown that IL-8 from human and rabbits is not able to induce pleocytosis [41, 42]. In addition, pleocytosis has not been shown to be directly correlated to a specific chemokine, but can be correlated to the shift of the type of invading leukocyte [17, 38, 43]. No correlation between the chemokines IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  levels and the total number of leucocytes in the CSF during BM was found. Even when separately comparing either CSF concentrations of IL-8 with neutrophil counts, or MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  with mononuclear cells in the CSF, no correlation was observed[17].

Even though the amount of cytokines and chemokines by cell counts differ between pathogens, the overall profile of these mediators in the CNS seems to be very similar. However, based on the IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-2 found in this study, *S. pneumoniae* can trigger a Th1 response, differing from *N. meningitidis* in this aspect, which needs to be better investigated. This information about T helper response may also facilitate the design of meningitis vaccines based on cell-mediated immunity and provide new approaches based on the susceptibility of each patient to the disease.

In summary, BM outcome is correlated with severity of the inflammatory response in the subarachnoid space, and then it is clear the importance of steroid therapy during BM. However, the benefit of adjunctive dexamethasone for all or any subgroup of patients with bacterial meningitis remains unproven [20, 44]. On the basis of our data on cytokine levels between PM and MM, no changes in the regimen of dexamethasone would be need. However, different pathogens seem trigger a heterogeneity of type and degree of immune response, thus advances in the pathogen-specific anti-inflammatory therapy during BM seem to be urgent.

## **Conclusions**

In this work, the basic knowledge of the expression of several cyto/chemokines during PM and MM was increased. The modulation of cytokine levels in meningitis of diverse bacterial etiologies may be a useful strategy to improve the outcome in terms of morbidity and mortality. However, other inflammatory proteins that could play important roles in the steps of immune response were not included in the present study. In the future, more systematic studies containing a greater number of individuals, expanding ranges of cytokines and associating with time, sequels and the outcome of meningitis disease should be anticipated to contribute to a more detailed understanding of the pathogenesis underlying meningitis.

## **Abbreviations**

BM: bacterial meningitis; CSF: cerebrospinal fluid; PM: pneumococcal meningitis; MM: meningococcal meningitis; WBC: white blood cell count; LP: lumbar puncture; CNS: central nervous system; PMN: polymorphonuclear granulocytes; IL: interleukin; CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand; MCP: monocyte chemotactic protein; CCL: chemokine (C-C motif) ligand; MIP: macrophage inflammatory protein; TNF- $\alpha$ : tumour necrosis factor-alpha; IFN- $\gamma$ : interferon-gamma; G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor.

## **Acknowledgements**

This work was supported by UBS Optimus Foundation and CNPq. We would like to thank the team of Hospital Giselda Trigueiro for their help with the sample collected. The authors LGC and LFAL are grateful to CNPq (Brazil) for the fellowships.

### Authors' contribution

LC performed the experiments, analyzed the data, and drafted the manuscript. DG aided in performing the experiments. SL designed the study and revised the manuscript. LA designed the study, analyzed the data, and revised the manuscript.

### Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interests.

### References

- [1] Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA: **Bacterial meningitis in the United States in 1995.** *N Engl J Med* 1997, **337**: 970–9762.
- [2] Silva WA, Pinheiro AM, Coutinho LG, Marinho LA, Lima LF: **Epidemiological profile of acute bacterial meningitis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2010, **43**:455-457.
- [3] Novaes HM, Sartori AM, Soárez PC: **Hospitalization rates for pneumococcal disease in Brazil, 2004 - 2006.** *Rev Saude Publica* 2011, **45**:539-547.
- [4] Sáfadi MA, Cintra OA: **Epidemiology of meningococcal disease in Latin America: current situation and opportunities for prevention.** *Neurol Res* 2010, **32**:263-271.
- [5] Tauber MG, Moser B: **Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications.** *Clin Infect Dis* 1999, **28**:1-11.
- [6] van Furth AM, Roord JJ, van Furth R: **Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy.** *Infect Immun* 1996, **64**:4883-4890.

- [7] Brandt CT, Caye-Thomasen P, Lund SP, Worsoe L, Ostergaard C, Frimodt-Moller N, Espersen F, Thomsen J, Lundgren JD: **Hearing loss and cochlear damage in experimental pneumococcal meningitis, with special reference to the role of neutrophil granulocytes.** *Neurobiol Dis* 2006, **23**:300-311.
- [8] Haberl RL, Anneser F, Kodel U, Pfister HW: **Is nitric oxide involved as a mediator of cerebrovascular changes in the early phase of experimental pneumococcal meningitis?.** *NeurolRes* 1994, **16**:108-112.
- [9] Leppert D, Leib SL, Grygar C, Miller KM, Schaad UB, Hollander GA: **Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae.** *ClinInfect Dis* 2000, **31**:80-84.
- [10] Zwijnenburg PJ, de Bie HM, Roord JJ, van der Poll T, van Furth AM: **Chemotactic activity of CXCL5 in cerebrospinal fluid of children with bacterial meningitis.** *J Neuroimmunol* 2003, **145**:148-153.
- [11] Azuma H, Tsuda N, Sasaki K, Okuno A: **Clinical significance of cytokine measurement for detection of meningitis.** *J Pediatr* 1997, **131**:463-465.
- [12] Klein M, Obermaier B, Angele B, Pfister HW, Wagner H, Koedel U, Kirschning CJ: **Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4.** *J Infect Dis* 2008, **198**:1028-1036.
- [13] Mogensen TH, Paludan SR, Kilian M, Ostergaard L: **Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns.** *J Leukocyte Biol* 2006, **80**:267-277.

- [14] Ribes S, Ebert S, Regen T, Agarwal A, Tauber SC, Czesnik D, Spreer A, Bunkowski S, Eiffert H, Hanisch UK, Hammerschmidt S, Nau R: **Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated *Streptococcus pneumoniae* by murine microglia.** *Infect Immun* 2010, **78**:865-871.
- [15] Sjolinder H, Mogensen TH, Kilian M, Jonsson AB, Paludan SR: **Important role for Toll-like receptor 9 in host defense against meningococcal sepsis.** *Infect Immun* 2008, **76**:5421-5428.
- [16] Kastenbauer S, Koedel U, Becker BF, Pfister HW: **Oxidative stress in bacterial meningitis in humans.** *Neurology* 2002, **58**:186-191.
- [17] Mastroianni CM, Lancellata L, Mengoni F, Lichtner M, Santopadre P, D'Agostino C, Ticca F, Vullo V: **Chemokine profiles in the cerebrospinal fluid (CSF) during the course of pyogenic and tuberculous meningitis.** *Clin Exp Immunol* 1998, **114**:210-214.
- [18] de Jonge RC, van Furth AM, Wassenaar M, Gemke RJ, Terwee CB: **Predicting sequelae and death after bacterial meningitis in childhood: a systematic review of prognostic studies.** *BMC Infect Dis* 2010, **10**:232.
- [19] Worsøe L, Cayé-Thomasen P, Brandt CT, Thomsen J, Østergaard C: **Factors associated with the occurrence of hearing loss after pneumococcal meningitis.** *Clin Infect Dis* 2010, **51**:917-924
- [20] Borchorst S, Møller K: **The role of dexamethasone in the treatment of bacterial meningitis - a systematic review.** *Acta Anaesthesiol Scand* 2012, doi: 10.1111/j.1399-6576.2012.02698.x

- [21] Dulkerian SJ, Kilpatrick L, Costarino AT Jr, McCawley L, Fein J, Corcoran L, Zirin S, Harris MC: **Cytokine elevations in infants with bacterial and aseptic meningitis.** *J Pediatr* 1995, **126**:872-876.
- [22] Glimaker M, Kragstjerg P, Forsgren M, Olcen P: **Tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in cerebrospinal fluid from patients with meningitis of different etiologies: high levels of TNF alpha indicate bacterial meningitis.** *J Infect Dis* 1993, **167**:882-889.
- [23] Kornelisse RF, Hack CE, Savelkoul HF, van der Pouw Kraan TC, Hop WC, van Mierlo G, Suur MH, Neijens HJ, de Groot R: **Intrathecal production of interleukin-12 and gamma interferon in patients with bacterial meningitis.** *Infect Immun* 1997, **65**: 877-881.
- [24] 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**:25-29.
- [25] Ohga S, Aoki T, Okada K, Akeda H, Fujioka K, Ohshima A, Mori T, Minamishima I, Ueda K: **Cerebrospinal fluid concentrations of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha, and interferon gamma in bacterial meningitis.** *Arch Dis Child* 1994, **70**:123-125.
- [26] Sharief MK, Ciardi M, Thompson EJ: **Blood-brain barrier damage in patients with bacterial meningitis: association with tumor necrosis factor-alpha but not interleukin-1 beta.** *J Infect Dis* 1992, **166**:350-358.
- [27] Akalin H, Akdis AC, Mistik R, Helvaci S, Kilicturgay K: **Cerebrospinal fluid interleukin-1 beta/interleukin-1 receptor antagonist balance and tumor necrosis factor-alpha concentrations in tuberculous, viral and acute bacterial meningitis.** *Scand J Infect Dis.* 1994, **26**:667-674.

- [28] Dalal I, Tzchori S, Somekh E, Mandelberg A, Levine A, Ballin A: **Cytokine profile in cerebrospinal fluid of children with echovirus type 4 meningitis.** *Pediatr Neurol* 2003, **29**:312-316.
- [29] Fida NM, Al-Mughales J, Farouq M: **Interleukin-1alpha, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in children with sepsis and meningitis.** *Pediatr Int* 2006, **48**:118-124.
- [30] Friedland JS, Shattock R, Remick DG, Griffin GE: **Mycobacterial 65-kD heat shock protein induces release of proinflammatory cytokines from human monocytic cells.** *Clin Exp Immunol* 1993, **91**:58-62.
- [31] Davenport V, Groves E, Hobbs CG, Williams NA, Heyderman RS: **Regulation of Th-1 T cell-dominated immunity to *Neisseria meningitidis* within the human mucosa.** *Cell Microbiol* 2007, **9**:1050-1061.
- [32] Holub M, Scheinostova M, Dzupova O, Fiserova A, Beran O, Kalmusova J, Musilek M, Krizova P: ***Neisseria meningitidis* strains from patients with invasive meningococcal disease differ in stimulation of cytokine production.** *Folia Microbiol* 2007, **52**:525-528.
- [33] Hessle C, Andersson B, Wold A E: **Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production.** *Infect Immun* 2000, **68**:3581-3586.
- [34] Borish LC, Steinke JW: **2. Cytokines and chemokines.** *J Allerg Clin Immun* 2003, **111**:S460-475.
- [35] D'Elis MM, Benagiano M, Della Bella C, Amedei A: **T-cell response to bacterial agents.** *J Infect Dev Ctries* 2011, **5**:640-645.

- [36] Olliver M, Hiew J, Mellroth P, Henriques-Normark B, Bergman P: **Human monocytes promote Th1 and Th17 responses to *Streptococcus pneumoniae*.** *Infect Immun* 2011, **79**:4210-4217.
- [37] Fortnum HM: **Hearing impairment after bacterial meningitis: a review.** *Arch Dis Child* 1992, **67**:1128-1133.
- [38] Hausler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK: **Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages.** *Eur J Neurosci* 2002, **16**:2113-2122.
- [39] Deshmukh SD, Kremer B, Freudenberg M, Bauer S, Golenbock DT, Henneke P: **Macrophages recognize streptococci through bacterial single-stranded RNA.** *EMBO reports* 2010, **12**:71-76.
- [40] Carrol ED, Guiver M, Nkhoma S, Mankhambo LA, Marsh J, Balmer P, Banda DL, Jeffers G, White SA, Molyneux EM, Molyneux ME, Smyth RL, Hart CA: **High pneumococcal DNA loads are associated with mortality in Malawian children with invasive pneumococcal disease.** *Pediatr Infect Dis J* 2007, **26**:416-422.
- [41] Dumont RA, Car BD, Voitenok NN, Junker U, Moser B, Zak O, O'Reilly T: **Systemic neutralization of interleukin-8 markedly reduces neutrophilic pleocytosis during experimental lipopolysaccharide-induced meningitis in rabbits.** *Infect Immun* 2000, **68**:5756-5763.
- [42] Ostergaard C, Yieng-Kow RV, Larsen CG, Mukaida N, Matsushima K, Benfield T, Frimodt-Moller N, Espersen F, Kharazmi A, Lundgren JD: **Treatment with a monoclonal antibody to IL-8 attenuates the pleocytosis in experimental pneumococcal meningitis in**

**rabbits when given intravenously, but not intracisternally.** *Clin Exp Immunol* 2000, **122**:207-211.

[43] Diab A, Abdalla H, Li HL, Shi FD, Zhu J, Hojberg B, Lindquist L, Wretling B, Bakhiet M, Link H: **Neutralization of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and MIP-1alpha attenuates neutrophil recruitment in the central nervous system during experimental bacterial meningitis.** *Infect Immun* 1999, **67**:2590-2601.

[44] van de Beek D, Farrar JJ, de Gans J, Mai NT, Molyneux EM, Peltola H, Peto TE, Roine I, Scarborough M, Schultz C, Thwaites GE, Tuan PQ, Zwinderman AH: **Adjunctive dexamethasone in bacterial meningitis: a meta-analysis of individual patient data.** *Lancet Neurol* 2010, **9**:254-263.

## Figures Legends

Fig. 1. Comparison of cyto/chemokines levels in CSF from *S. pneumoniae* and *N. meningitidis* patients. *S. pneumoniae* patients showed similar levels of cyto/chemokines compared to *N. meningitidis* patients, except for IFN- $\gamma$  ( $P < 0.05$  by Mann Whitney test). IL-8 shows a lower number of samples due to CSF availability

Fig.2. Levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in the CSF of patients with LP within 48h from initial symptoms. *S. pneumoniae* patients showed higher levels of IFN- $\gamma$  compared to *N. meningitidis* patients ( $P < 0.01$  by Mann Whitney test). The level of TNF- $\alpha$  in the patients with MM was significantly higher than patients with PM ( $P < 0.05$  by Mann Whitney test).

Fig.3. Comparison of cytokine levels in patients with LP after 48h from initial symptoms. *S. pneumoniae* patients showed higher levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  compared to *N. meningitidis* patients ( $P < 0.05$  by Mann Whitney test).

Fig. 4. Ratio between cyto/chemokines and the number of PMN cells during infection. Each value of cyto/chemokine was individually divided per amount of cells. During pneumococcal meningitis (●) cells demonstrated higher ability to release cyto/chemokines than meningococcal meningitis (○). IL-8 shows a lower number of samples due to CSF availability.

Table 1. Categorization of the meningitis etiologies according CSF routine investigation.

| <b>CSF (n samples)</b>      | <b>Age<sup>a</sup><br/>(years)</b> | <b>Cell count<sup>a</sup><br/>(cells/mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Protein<sup>b</sup><br/>(g/l)</b> | <b>Glucose<sup>a</sup><br/>(mg/dl)</b> |
|-----------------------------|------------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| <i>S. pneumoniae</i> (16)   | 30 (5; 53)                         | 733 (396; 2,520)   | 211.6 ± 51.45                        | 17.5 (5; 57)                           |
| <i>N. meningitidis</i> (12) | 23 (7; 27)                         | 3,360 (929; 12,925) <sup>c</sup>                         | 150.4 ± 29.8                         | 44.5 (5; 60)                           |

<sup>a</sup> Values are represented as median (25; 75 percentiles); <sup>b</sup> Values are represented as mean ±

SE; <sup>c</sup> Significant value compared to *S. pneumoniae* ( $P \leq 0.05$ ).

Table 2. Comparative literature screening of cytokine measurements in CSF from pneumococcal and meningococcal meningitis patients.

| IL-1β             |             | TNF-α       |             | IL-6        |             | IFN -γ      |             | IL-10       |             | MIP-1α      |             | MCP-1       |             | IL-8        |             | References |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <i>S.p.</i>       | <i>N.m.</i> | <i>S.p.</i> | <i>N.m.</i> | <i>S.p.</i> | <i>N.m.</i> | <i>S.p.</i> | <i>N.m.</i> | <i>S.p.</i> | <i>N.m.</i> | <i>S.p.</i> | <i>N.m.</i> | <i>S.p.</i> | <i>N.m.</i> | <i>S.p.</i> | <i>N.m.</i> |            |
| 2988 <sup>c</sup> | 268         | 4238        | 57          |             |             | 2.5 (u/ml)  | <0.1 (u/ml) |             |             |             |             |             |             |             |             | [25]       |
| (3)               | (3)         | (3)         | (3)         |             |             | (3)         | (3)         |             |             |             |             |             |             |             |             |            |
| 320               | 300         | 450         | 500         |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             | [26]       |
| (10)              | (18)        | (10)        | (18)        |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |            |
|                   |             | 584         | 2827        |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             | [22]       |
|                   |             | (14)        | (7)         |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |            |
|                   |             | 2324        | 414         |             |             | 100%        | 46%         | 736         | 654         |             |             |             |             |             |             | [23]       |
|                   |             | (6)         | (13)        |             |             | (6)         | (13)        | (6)         | (13)        |             |             |             |             |             |             |            |
|                   |             | 140         | 2007        | 8225        | 4500        |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             | [21]       |
|                   |             | (2)         | (1)         | (4)         | (1)         |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |            |
|                   |             | 23.69       | 86          | 9.36        | 44.8        |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             | [24]       |
|                   |             | (2)         | (4)         | (2)         | (4)         |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |            |
|                   |             |             |             |             |             |             |             |             |             | 23          | 25          | 3145        | 4604        | 4454        | 4525        | [17]       |
|                   |             |             |             |             |             |             |             |             |             | (7)         | (5)         | (7)         | (5)         | (7)         | (5)         |            |

*S.p.* = *Streptococcus pneumoniae*; *N.m.* = *Neisseria meningitidis*; Values without units are in pg/mL. Parenthesis shows the number of patients included in each study.

Assunto: 1195662074784099 Resubmission 3 Cerebrospinal-fluid cytokine and chemokine profile in patients with pneumococcal and meningococcal meningitis

Article title: Cerebrospinal-fluid cytokine and chemokine profile in patients with pneumococcal and meningococcal meningitis

MS ID : 1195662074784099

Authors : Leonam G Coutinho, Denis Grandgirard, Stephen L Leib and Lucymara F Agnez-Lima

Journal : BMC Infectious Diseases

Dear Dr Agnez-Lima

Thank you for submitting a new version of your article.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures.