

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

ALLAN MINATTO COLLODEL

**TRAJETÓRIAS DE NEUROINFLAMAÇÃO PRECEDEM O
COMPROMETIMENTO COGNITIVO APÓS MODELO DE MENINGITE
PNEUMOCÓCICA - EVIDÊNCIA DE UM ESTUDO PET *IN VIVO***

**CRICIÚMA,
DEZEMBRO DE 2021**

ALLAN MINATTO COLLODEL

**TRAJETÓRIAS DE NEUROINFLAMAÇÃO PRECEDEM O
COMPROMETIMENTO COGNITIVO APÓS MODELO DE MENINGITE
PNEUMOCÓCICA - EVIDÊNCIA DE UM ESTUDO PET *IN VIVO***

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

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Barichello

**CRICIÚMA,
DEZEMBRO DE 2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C714t Collodel, Allan Minatto.

Trajetórias de neuroinflamação precedem o comprometimento cognitivo após modelo de meningite pneumocócica - evidência de um estudo pet *in vivo* / Allan Minatto Collodel. - 2021.

93 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2021.

Orientação: Tatiana Barichello.

1. Meningite bacteriana. 2. Neuroinflamação.
3. Disfunção cognitiva. 4. Microglia. I. Título.

CDD 23. ed. 616.82

FOLHA INFORMATIVA

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

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha orientadora, Profa. Dra. Tatiana Barichello, que me deu a oportunidade, ainda na graduação, de entrar para a sua equipe. Pela confiança em mim depositada para elaboração de inúmeros trabalhos, sempre me ajudando e dando dicas para cada vez melhorar ainda mais.

Agradeço também a Dra. Jaqueline da Silva Generoso que em toda a graduação, mestrado e doutorado me auxiliou em todas as etapas e pela amizade e companheirismo que sempre estiveram presentes em todo o nosso trabalho e ficará para sempre em minhas lembranças.

Agradeço a banca, ter aceitado o meu convite, a Profa. Dra Josiane Budini que foi a relatora do trabalho, a Prof. Dra. Alexandra Ioppi Zugno, Prof. Dr. Renan Ceretta e Prof. Dra. Patrícia Fernanda Schuck.

Por fim, quero agradecer aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e principalmente FAPESC e UNESC pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro necessário a execução dos experimentos que compõem esta tese.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOCTORADO** apresentada pelo candidato **ALLAN MINATTO COLLODEL**, sob o título “**TRAJETÓRIAS DE NEUROINFLAMAÇÃO PRECEDEM O COMPROMETIMENTO COGNITIVO APÓS MODELO DE MENINGITE PNEUMOCÓCICA – EVIDÊNCIA DE UM ESTUDO PET IN VIVO**” do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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

Criciúma, SC, 17 de dezembro de 2021.

Profa. Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Relator – UNESC

Profa. Dra. ALEXANDRA ZUGNO
Membro Interno – UNESC

Prof. Dr. RENAN ANTONIO CERETTA
Membro Externo – PPGSCOL

Profa. Dra. PATRICIA FERNANDA SCHUCK
Membro Externo – UFRJ

Profa. Dra. Tatiana Barichello
Orientadora

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

RESUMO

A meningite bacteriana é uma infecção devastadora do sistema nervoso central (SNC) com consequências neurológicas agudas e de longo prazo, incluindo comprometimento cognitivo. Esta infecção apresenta baixa incidência em países desenvolvidos, porém ainda é muito grave para países de baixa renda. O objetivo deste estudo foi compreender a associação entre a neuroinflamação induzida pela microglia ativada e o comprometimento cognitivo em modelo experimental de meningite pneumocócica. Foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos, submetidos a uma inoculação de *Streptococcus pneumoniae* na concentração de 5×10^9 UFC/mL no cérebro através da cisterna magna para a indução do modelo de meningite pneumocócica. Os ratos do modelo de longo prazo foram então tratados com ceftriaxona durante 7 dias. Para determinar a ativação microglial *in vivo*, 24 horas (agudo) e 10 dias (longo prazo) após a indução da meningite, os ratos foram submetidos a uma tomografia por emissão de pósitrons (PET) usando ^{11}C -PBR28, um radiotraçador específico para proteína translocadora mitocondrial (TSPO). O TSPO tem um papel importante em processos inflamatórios de tecidos periféricos e no sistema nervoso como uma resposta a lesões e doenças. Após a imagem, os animais foram eutanasiados e a expressão de TSPO, cardiolipina e citocromo-c, mediadores inflamatórios, marcadores de estresse oxidativo e marcadores de ativação glial foram avaliados no córtex frontal e no hipocampo. Os animais do grupo 10 dias, foram submetidos a testes comportamentais após a tomografia, como os testes de habituação ao campo aberto, esQUIVA inibitória e testes de reconhecimento de objetos novos. Os ratos dos grupos 24 horas e 10 dias demonstraram aumento da expressão de ^{11}C -PBR28 e ativação das células da glia em todo o cérebro em comparação com os níveis do grupo controle. Mesmo os animais já livres de infecção, o grupo de 10 dias, exibiram níveis aumentados da expressão citocinas e marcadores de estresse oxidativo, ativação microglial (IBA-1) e ativação de astrócitos (GFAP). Resultados semelhantes aos que foram observados no grupo de 24 horas. Também foi observado que a indução da meningite aguda também elevou os níveis de TSPO, citocromo-c e caspase-3, mas não alterou os níveis de caspase-9. Já nos animais que foram avaliados 10 dias após a indução da meningite, os níveis de TSPO, citocromo-c, caspase-3 e caspase-9 estavam regulados positivamente no hipocampo, porém com uma redução simultânea nos níveis de cardiolipina. Os animais mostraram um declínio cognitivo em todas os testes comportamentais realizados, em comparação com o grupo controle, o que leva a crer que este comprometimento pode ser pelo menos parcialmente resultado de uma ativação imune mediada pelas células da glia e pela regulação positiva de TSPO. O TSPO-PET pode ser potencialmente usado como um biomarcador de imagem para ativação glial, marcador de neuroinflamação e comprometimento cognitivo de longo prazo pós-meningite. Além disso, este estudo abre um novo caminho para o uso potencial de ligantes de TSPO após sequelas neurológicas induzidas por infecção.

Palavras-chave: meningite, inflamação, microglia, TSPO, comprometimento cognitivo

ABSTRACT

Bacterial meningitis is a devastating central nervous system (CNS) infection with acute and long-term neurological consequences, including cognitive impairment. This infection is low in developed countries, but it is still very serious for low-income countries. The aim of the study was to understand the association between activated microglial-induced neuroinflammation and cognitive impairment in an experimental model of pneumococcal meningitis. It was used in adult male Wistar rats, inoculated with *Streptococcus pneumoniae* at a concentration of 5×10^9 CFU/ml in the brain through the cisterna magna, and the rats in the long-term model were then treated with ceftriaxone for 7 days. To determine microglial activation in vivo, 24 hours (acute) and 10 days (long term) after induction of meningitis, rats were found on a positron emission tomography (PET) scan using ^{11}C -PBR28, a specific radiotracer for translocating protein (TSPO). After imaging, the animals were euthanized and the expression of TSPO, cardiolipin and cytochrome c, inflammatory mediators, oxidative stress markers and glial activation markers obtained in the frontal cortex and hippocampus. The animals in the 10-day group were collected for behavioral tests after the tomography, such as the open field habituation tests, inhibitory avoidance and new object recognition tests. The 24-h and 10-day rat groups demonstrated increased expression of ^{11}C -PBR28 and glial cell activation throughout the brain compared to levels in the control group. Even animals already free of infection, rats from the 10-day group exhibited increased expression levels of cytokines and markers of oxidative stress, microglial activation (IBA-1) and astrocyte activation (GFAP). A result similar to what was observed in the 24-hour group. It was also observed that the induction of acute meningitis also elevated TSPO, cytochrome c and caspase-3 levels, but did not alter caspase-9 levels. In animals that were obtained 10 days after meningitis induction, TSPO, cytochrome c, and caspase-3 and caspase-9 levels were up-regulated in the hippocampus, but with a simultaneous reduction in cardiolipin levels. The animals impaired cognitive decline on all behavioral tests compared to the control group, which suggests that this impairment may be at least partially a result of glial cell-mediated immune activation and up-regulation of TSPO. TSPO-PET can potentially be used as an imaging biomarker for glial activation, a marker of neuroinflammation, and post-meningitis long-term cognitive impairment. Furthermore, this study opens a new avenue for the potential use of TSPO ligands after infection-induced neurological sequelae.

Keywords: meningitis, inflammation, microglia, TSPO, cognitive impairment

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1: Passagem da bactéria pela BHE.....	20
Figura 2: Fisiopatologia da meningite bacteriana..	23
Figura 3: O MPTP atua na via da apoptose.....	28
Figura 4: Delineamento experimental. Figura elaborada pelo autor.	34
Figura 5: Representação do teste de habituação ao campo aberto.....	42
Figura 6: Representação do teste de reconhecimento de objetos novos.....	43
Figura 7: Representação do teste de esquiva inibitória.	44
Figura 8: Imagem PET <i>in vivo</i> de TSPO usando ¹¹ C-PBR28.	47
Figura 9: Estresse oxidativo elevado e defesa enzimática reduzida após meningite experimental..	49
Figura 10: Regulação positiva de marcadores gliais 24 horas após a indução experimental de meningite no córtex frontal e hipocampo.	52
Figura 11: Regulação positiva de marcadores gliais 10 dias após a indução experimental de meningite no córtex frontal e hipocampo.	53
Figura 12: Aumento da ativação microglial 24 horas após a indução experimental da meningite..	55
Figura 13: Aumento da ativação microglial 24 horas após a indução experimental da meningite.	56
Figura 14: Aumento da ativação microglial 10 dias após a indução experimental da meningite..	57
Figura 15: Aumento da ativação microglial 10 dias após a indução experimental da meningite..	58
Figura 16: Aumento da ativação astrogliar 24 horas após a indução experimental da meningite..	59
Figura 17: Aumento da ativação astrogliar 24 horas após a indução experimental da meningite.	60
Figura 18: Aumento da ativação astrogliar 10 dias após a indução experimental da meningite..	61
Figura 19: Aumento da ativação astrogliar 10 dias após a indução experin l da meningite..	62
Figura 20: Regulação positiva da expressão do alvo neuroimunomodulador TSPO 24 h após a indução experimental de meningite no córtex frontal e hipocampo.	63

Figura 21: Aumento da expressão do alvo neuroimunomodulador TSPO 10 dias após a indução experimental de meningite no córtex frontal e hipocampo..	64
Figura 22: Níveis diminuídos de cardiolipina e níveis elevados de caspase após meningite experimental.	65
Figura 23: A - Teste de campo aberto. B - Tarefa de esquiva inibitória. C - Representação esquemática do teste de reconhecimento de objetos novos. D - Atividade locomotora. E - Índice de reconhecimento.	67
Tabela 1: Níveis aumentados de mediadores inflamatórios 24 horas após a indução experimental de meningite no córtex frontal e hipocampo.	50
Tabela 2: Níveis aumentados de mediadores inflamatórios 10 dias após a indução experimental de meningite no córtex frontal e hipocampo.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIF - fator indutor de apoptose (do inglês: apoptosis-inducing factor)
- ANTs - translocadores de nucleótidos de adenina (do inglês: adenine nucleotide translocators)
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AP-1 - proteína adaptadora-1 (do inglês: adapter protein)
- APAF-1 - fator de ativação da peptidase apoptótica 1 (do inglês: apoptotic peptidase activating factor)
- ASC - domínio de recrutamento de caspase
- BCA - bicinconínico
- BHE - barreira hematoencefálica
- BSA - albumina de soro bovino (do inglês: bovine serum albumin)
- CAT - Catalase
- clAP2 - inibidores celulares de apoptose
- DAMPs - padrões moleculares associados ao dano (do inglês: molecular patterns associated with damage)
- DNA e RNA - ácidos nucleicos
- EPM – erro padrão da média
- ERK-1/2 - quinase regulada por sinal extracelular (do inglês: extracellular signal regulated kinase)
- ERO - espécies reativas de oxigênio
- GFAF - proteína glial fibrilar ácida (do inglês: glial fibrillary acidic protein)
- HIV - vírus da imunodeficiência humana (do inglês: human immunodeficiency vírus)
- i.p. - intraperitoneal
- IAP - inibidor da proteína de apoptose (do inglês: apoptosis protein inhibitor)
- IBA1 - molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizante (do inglês: Ionized calcium binding adapter molecule 1)
- ICAM - moléculas de adesão intercelular (do inglês: intercellular adhesion molecules)
- IF - Imunofluorescência
- IL - interleucina
- iNOS - óxido nítrico sintase induzível (do inglês: inducible nitric oxide synthase)
- IRAK - receptor de interleucina-1 associada à quinase (do inglês: Interleukin Receptor Kinase-Associated)

JNK - Proteína c-jun N-terminal

kDa - quilodalton

LCR - líquido cefalorraquidiano

LPS - lipopolissacarídeos

MAPK - proteína quinases ativadas por mitógenos (do inglês: mitogen-activated protein kinases)

MDA - malondialdeído

mg/kg – miligramas por kilogramas

MLEM - maximização da expectativa de máxima verossimilhança

MPO - mieloperoxidase

MyD88 - proteína de diferenciação mielóide 88 (do inglês: myeloid differentiation protein)

NF-κB - fator de transcrição nuclear-κB (do inglês: nuclear transcription factor-κB)

NLRP3 - receptor tipo NOD contendo domínio de pirina 3 (do inglês: NOD-like receptor with pyrin 3 domain)

NLRs - receptores do tipo NOD (do inglês: NOD-like receptor)

NOD - domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos (do inglês: nucleotide binding oligomerization domain)

PAFr - receptor do fator de ativação de plaquetas (do inglês: platelet activating factor receptor)

PAMPs - padrões moleculares associados ao patógeno (do inglês: molecular patterns associated with the pathogen)

PBR - receptor periférico de benzodiazepina (do inglês: peripheral benzodiazepine receptor)

PBS - tampão fosfato-salino (do inglês: phosphate buffer saline)

PChO - fosforilcolina

PET - Tomografia por emissão de Pósitrons (do inglês: Positron Emission Tomography)

PET-TC - Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (do inglês: Positron Emission Computed Tomography)

PGN - peptidoglicano

pIgR - receptor da poli imunoglobulina (do inglês: poly immunoglobulin receptor)

Ply – pneumolisina (do inglês: pneumolysin)

PRRs - receptores de reconhecimento padrão (do inglês: pattern recognition receptors)

PspC - proteína pneumocócica da superfície C

RIP2 - receptor que interage com a proteína-2

RPM – rotações por minuto

SMAC - ativador derivado de mitocôndrias da caspase

SNC - sistema nervoso central

SOD - superóxido dismutase

TAB - proteína de crescimento

TAK1 – TGF β ativador de kinase 1

TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: thiobarbituric acid reactive species)

TCA - ácido tricloroacético (do inglês: trichloroacetic acid)

TGF β - fator transformador de crescimento β

TIRAP - proteína adaptadora que contém TIR (do inglês: transforming growth factor β)

TLRs - receptores tipo Toll (do inglês: Toll like receptor)

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa (do inglês: tumor necrosis factor)

TRAF - receptor de TNF (do inglês: TNF receptor associated factor)

TRAM - molécula adaptadora relacionada ao TRIF (do inglês: TRIF-related adaptor molecule)

TSPO - proteína translocadora de 18 kDa

UFCol/mL - unidades formadoras de colônias por mL

VDACs - canais aniônicos dependentes da tensão (do inglês: voltage-dependent anionic channels)

XIAP - inibidor da proteína de apoptose ligada ao X (do inglês: X-linked apoptosis protein inhibitor)

μ L – microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Meningite bacteriana.....	16
1.2	Fisiopatologia.....	18
1.3	Microglia.....	24
1.4	Estresse oxidativo.....	25
1.5	Proteína translocadora mitocondrial.....	26
1.6	Justificativa.....	30
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivo geral.....	31
2.2	Objetivos específicos.....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1	Locais de realização da pesquisa.....	32
3.2	Fármacos e substâncias.....	32
3.3	Modelo animal de meningite pneumocócica.....	33
3.4	Grupos experimentais.....	34
3.5	PET/TC scanner.....	35
3.6	Avaliação bioquímica.....	35
3.6.1	Parâmetros de estresse oxidativo/nitrosativo.....	35
3.6.2	Análise por imunotransferência.....	37
3.6.3	Ensaio multiplex para quantificação de citocinas.....	39
3.6.4	Imunofluorescência.....	40
3.6.5	ELISA.....	41
3.7	Avaliação comportamental.....	42
3.7.1	Habituação ao campo aberto.....	42
3.7.2	Teste de reconhecimento de objetos novos.....	43
3.7.3	Esquiva inibitória.....	43
3.8	Análise estatística.....	44
4	RESULTADOS.....	46
4.1	Aumento da ativação microglial.....	46
4.2	Marcadores de estresse oxidativo.....	48
4.3	Mediadores inflamatórios.....	49
4.4	Ativação das células gliais.....	51
4.5	Regulação positiva da expressão de TSPO e disfunção mitocondrial após meningite experimental.....	62
4.6	Declínio cognitivo avaliado em ratos sobreviventes de meningite.....	66

5	DISCUSSÃO.....	68
6	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS.....	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 MENINGITE BACTERIANA

A meningite é uma doença infecciosa, causada por inflamação das meninges (pia-máter e aracnoide) e do espaço subaracnóideo (Van De Beek et al., 2016). A doença inicia com uma invasão de microrganismos no sistema nervoso central (SNC), através do líquido cefalorraquidiano (LCR), seguida de uma exacerbada resposta inflamatória do hospedeiro (Liechti et al., 2015).

Esta doença pode ter causas infecciosas e não infecciosas, como exemplo das infecciosas estão os vírus, fungos, parasitas ou diversas bactérias como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus aureus* (Ellis et al., 2019). A meningite bacteriana pode ser adquirida na comunidade, quando o patógeno causador está no hospedeiro e desencadeia a doença ou após procedimentos invasivos, traumas e complicações, chamada de meningite nosocomial (Van De Beek et al., 2010; Costerus et al., 2017). A meningite pode ser ocasionada quando a bactéria se espalha pela corrente sanguínea, atravessa e se multiplica nas meninges, ou a partir de outra fonte de infecção como sinusite ou otite. Outros fatores de risco são cirurgia cerebral, doenças crônicas ou doenças autoimunes (Van De Beek et al., 2016).

A incidência da meningite bacteriana em países com alta renda, como na Finlândia, é de aproximadamente 0,7 por 100.000 (Polkowska et al., 2017), nos Estados Unidos 0,8 por 100.000 (Castelblanco et al., 2014) e na Holanda 0,9 por 100.000 habitantes (Bijlsma et al., 2016). Os números da Europa e dos Estados Unidos estão em nítido contraste com os relatados em Burkina Faso, na África, que apresentou uma incidência anual de 24,7 casos para cada 100.000 habitantes (Kambire et al., 2016).

Os tipos de meningite bacteriana mais comuns são a meningite meningocócica ocasionada pela bactéria *N. meningitidis* e a meningite pneumocócica ocasionada pelo *S. pneumoniae* (Thigpen et al., 2011). Um estudo de 2017 na Finlândia demonstrou que a maioria dos casos de meningite bacteriana é causada pelo pneumococo, sendo ele responsável por 45 a 72% dos casos, enquanto o meningococo responsável por 11 a 33% dos casos (Polkowska et al., 2017). Um

estudo recente fornece um parâmetro semelhante na Inglaterra e no País de Gales, em que a meningite pneumocócica teve um incidência de 0,18 por 100.000 habitantes enquanto a meningite meningocócica atingiu 0,06 casos a cada 100.000 habitantes, seguidos pelos patógenos *E. coli* com 0,07, *H. influenzae* com 0,02, *L. monocytogenes* com 0,02 e *S. agalactiae* com 0,01 casos a cada 100.000 habitantes (Ellis et al., 2019). Burkina Faso também teve a meningite pneumocócica como causa mais comum, com dados positivos em 53% dos casos para a cultura de *S. pneumoniae* no LCR (Kambire et al., 2016).

Embora a incidência de meningite bacteriana nos países ocidentais tenha diminuído gradualmente nos últimos 10 a 20 anos, de 3 a 4% para 0,7 a 0,9 casos a cada 100.000 habitantes por ano, nos países africanos as taxas de incidência ainda alcançam a faixa de 10 a 40 casos a cada 100.000 habitantes por ano (Brouwer e Van De Beek, 2018). As taxas relatadas de fatalidade em casos de meningite bacteriana variam de 17 a 40%, dependendo do patógeno causador e do nível de renda do país. Em hospitais mais avançados, as taxas de mortalidade ainda variam entre 5 e 18% (Buchholz et al., 2016; Hasbun et al., 2017) mas são substancialmente mais altas, atingindo mais de 30% quando consideradas globalmente (Mcgill et al., 2016). Já as sequelas neuropsiquiátricas de longo prazo chegam a atingir até 50% dos sobreviventes (Hoogman et al., 2007; Heath et al., 2011; Ellis et al., 2019), podendo apresentar sequelas neurológicas de longo prazo, como perda auditiva, convulsões ou disfunção neurocognitiva (Buchholz et al., 2016; Lucas et al., 2016).

Nos dados mais atuais no Brasil, foram relatados 9.441 casos de meningite pneumocócica entre 2010 e 2018, com uma média de 1.049 casos de meningite por ano e 2.763 óbitos. Já a meningite meningocócica foram 16.793 casos, com média de 1.866 casos por ano e 3.576 mortes. Esses valores ainda podem ser maiores pois há mais de 26 mil casos de meningite não especificada neste mesmo período. Com base nesses dados, pode-se observar que a média de letalidade de meningite meningocócica foi de 22%, já a taxa de letalidade da meningite pneumocócica ficou em 30% (Sinan, 2017). Devido à alta taxa de letalidade a meningite pneumocócica se torna um objeto de estudo extremamente importante.

1.2 FISIOPATOLOGIA

O *S. pneumoniae* é um diplococo gram-positivo, encapsulado em forma de lanceta disposto em pares, cujo principal nicho ecológico é a nasofaringe humana, o que geralmente leva a colonização assintomática (Sellner et al., 2010; Mook-Kanamori et al., 2011). Este microrganismo é transmitido por tosse e espirro e continua sendo a forma mais comum de meningite bacteriana adquirida na comunidade em adultos (Bijlsma et al., 2016; McGill et al., 2016). Na última década, um trabalho experimental forneceu evidências de que a morte e as sequelas devido à meningite pneumocócica ocorrem como consequência de uma resposta hiperinflamatória do hospedeiro ao patógeno (Meli et al., 2006).

Após a colonização, o *S. pneumoniae* pode se tornar invasivo e se espalhar do trato respiratório superior para outros órgãos, levando a doenças graves como pneumonia, sepse ou meningite (Henriques-Normark e Tuomanen, 2013). Esta bactéria pode atingir o espaço subaracnóideo através da corrente sanguínea ou através da disseminação de infecções de locais próximos, como os seios paranasais ou mastóide do ouvido interno (Van De Beek et al., 2016). A principal via para as bactérias atingirem as meninges e entrar no espaço subaracnóideo é através da corrente sanguínea (Mook-Kanamori et al., 2011). Os mecanismos exatos pelos quais as infecções bacterianas ocorrem em alguns indivíduos, mas não em outros, não são claros, mas parecem depender de uma interação complexa entre fatores ambientais, como infecção prévia pelo vírus influenza, tabagismo ou abuso de álcool, fatores genéticos do hospedeiro e o próprio patógeno (Brouwer et al., 2009).

Uma vez que o *S. pneumoniae* alcança a corrente sanguínea, sua cápsula de polissacarídeos é antifagocítica e age como escudo inerte, inibindo a deposição superficial de opsoninas, especialmente os fatores de complemento (Doran et al., 2016). Além da cápsula, uma série de moléculas da superfície bacteriana reduzem os danos causados pelo complemento (Johswich et al., 2012). Assim que as bactérias atingem os vasos sanguíneos cerebrais, elas precisam atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) para entrar no cérebro e causar uma infecção. Em análises de imunofluorescência combinadas com microscopia confocal de alta resolução, foi demonstrado claramente que a bactéria *S. pneumoniae* adere ao endotélio vascular cerebral antes da invasão do cérebro (Iovino et al., 2013). É demonstrado que altos níveis prolongados de bacteremia favorecem a penetração bacteriana de *S.*

pneumoniae no espaço subaracnóideo em humanos e modelos experimentais em animais, provavelmente aumentando diretamente a probabilidade de as bactérias interagirem com as células endoteliais da BHE (Mook-Kanamori et al., 2011).

O mecanismo predominante pelo qual o *S. pneumoniae* utiliza para atravessar a BHE é a transcitose mediada por receptores das camadas celulares endoteliais e epiteliais (Ring et al., 1998). O passo inicial da adesão parece ser mediado pela ligação de adesinas bacterianas, como a proteína pneumocócica da superfície C (PspC) que interage com o receptor da laminina ou com o receptor da poli imunoglobulina (plgR) nas células endoteliais do cérebro, pois o bloqueio do mesmo reduz a adesão bacteriana (Iovino et al., 2013). Outra interação é entre a fosforilcolina (PChO) da parede celular e o receptor do fator de ativação de plaquetas (PAFr) nas células endoteliais (Kim, 2008), já que foi demonstrado que camundongos *knockout* para PAFr mostraram uma capacidade comprometida na translocação bacteriana do sangue para o cérebro (Radin et al., 2005). Além disso, o *S. pneumoniae* também pode translocar-se para o LCR intracelularmente, rompendo junções intraepiteliais estreitas (Kim, 2008) conforme mostrado na figura 1.

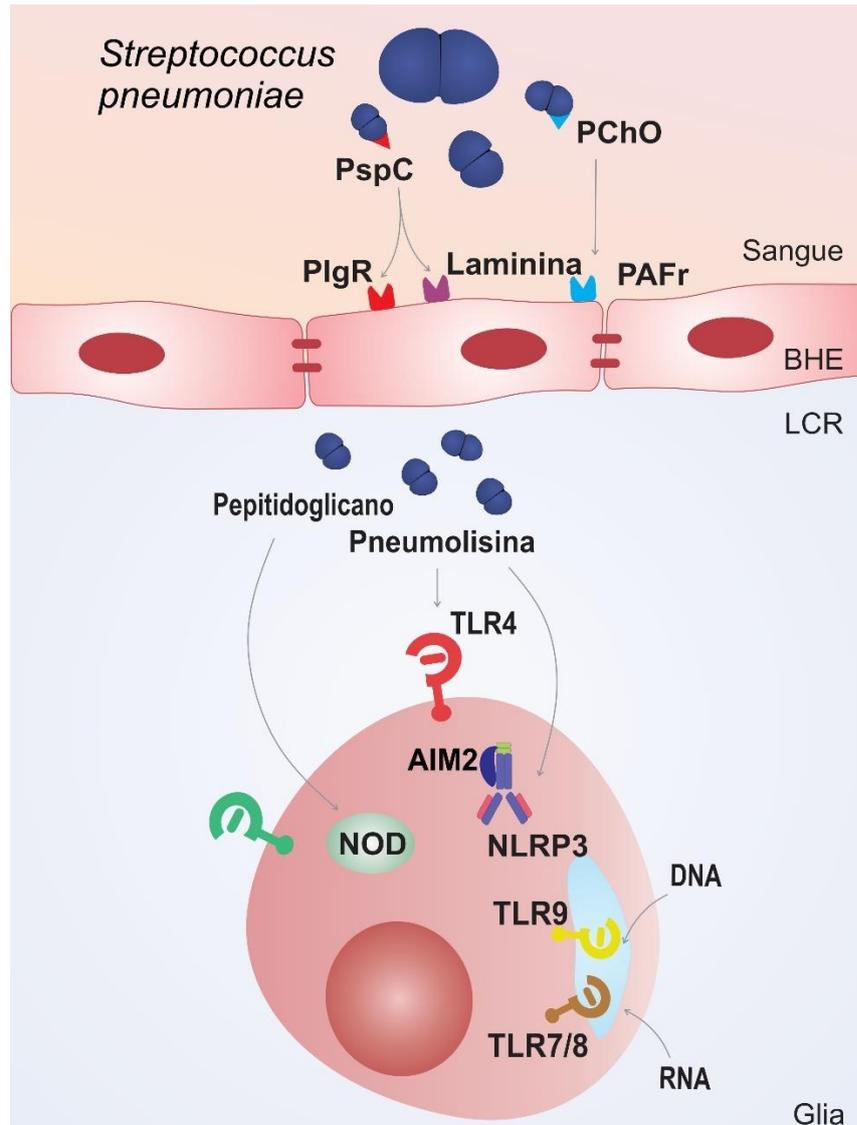


Figura 1: Passagem da bactéria pela BHE. As moléculas de adesão (PspC e PChO) da bactéria *S. pneumoniae*, se ligam a receptores celulares de células epiteliais da BHE (laminina, PlgR e PAFr) para ultrapassá-la, invadindo o LCR. As bactérias se replicam no LCR e liberam fragmentos de suas estruturas (PGN, Ply, DNA e RNA) que podem ativar vias inflamatórias através dos TLRs, NOD e inflamassoma. Figura elaborada pelo autor.

Quando os patógenos atingem o LCR, é provável que sobrevivam porque as defesas do hospedeiro no espaço subaracnóideo parecem ser ineficazes. Uma vez no LCR a densidade bacteriana aumenta, os patógenos começam a sofrer lise em resposta a várias condições de estresse, como privação de nutrientes e tratamento com antibióticos (Koedel et al., 2002). Fragmentos bacterianos, chamados de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), como peptidoglicano (PGN), pneumolisina (Ply), ácidos nucleicos (DNA ou RNA) podem se acumular dentro do LCR, serem fagocitados, e/ou interagirem com os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) das células gliais, como os receptores tipo *Toll* (TLRs), NOD (domínio

de oligomerização de ligação a nucleotídeos) ou inflamassoma, ligados à superfície ou intracelulares que são expressos por células imunocompetentes, desencadeando a resposta imune do hospedeiro (Van De Beek et al., 2016) conforme mostrado na figura 1.

O sistema imune inato detecta patógenos através de várias famílias de receptores. Os TLRs reconhecem PAMPs, que são expressos por patógenos ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que são proteínas endógenas liberadas pelo insulto aos tecidos (Hanke e Kielian, 2011). Os TLR estão organizados em duas grandes categorias: um grupo de receptores é expresso na superfície celular para reconhecimento de ligantes extracelulares (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10) e o outro grupo está localizado em compartimentos endossômicos intracelulares para reconhecer ácidos nucleicos de patógenos (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) (Kigerl et al., 2014). A Ply, uma importante exotoxina produzida pelo *S. pneumoniae*, é reconhecida pelo TLR4 que utiliza a proteína adaptadora que contém receptor Toll/IL-1 (TIR) (TIRAP) ativando a proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e a molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM) para estimular a produção de mediadores pró-inflamatórios (Kumar et al., 2013).

Após o recrutamento por TLRs, a molécula adaptadora MyD88 se associa ao receptor de interleucina-1 associada à quinase (IRAK) -4, que é uma serina/treonina-quinase que fosforila IRAK-1 e IRAK-2 (Wang et al., 2006). Posteriormente, o IRAK interage com a família do fator associado ao receptor de TNF (TRAF) promovendo uma ligação ao complexo TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 (Heiman et al., 2014). TAK1 fosforila o complexo NEMO/IKK α /IKK β , que por sua vez fosforila IKB, resultando na ativação e liberação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (Koedel et al., 2000).

O NF- κ B é um ativador transcricional de várias proteínas envolvidas na inflamação, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-1 β e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Koedel et al., 2000). As citocinas inflamatórias, como TNF- α , são necessárias para induzir a expressão das moléculas de adesão intercelular (ICAM)-1 e ICAM-2. A ligação entre as células endoteliais e o ICAM-1 permite a passagem de leucócitos na direção do gradiente quimiotático (Hanna e Etzioni, 2012).

A ativação da TAK1 também está associada à via da proteína quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Além disso, MAPKK-3/6, MAPKK-4/7 e MEK-1/2

induzem a ativação de p38, quinase c-jun N-terminal (JNK) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK-1/2), respectivamente. Essas cascatas levam à translocação da proteína adaptadora-1 (AP-1) para o núcleo, promovendo a transcrição de citocinas inflamatórias (Heiman et al., 2014). Que por sua vez, se ligam a receptores específicos, ativando uma cascata intracelular promovendo a transcrição de genes, podendo ativar ou regular a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como: IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e TNF, ou anti-inflamatórias como: IL-4, IL-10, IL-13 e fator transformador de crescimento β (TGF β) (Curfs et al., 1997), tornado um ciclo que exacerba ainda mais a inflamação e suas consequências. As células gliais, células endoteliais, células endodimais e macrófagos residentes no cérebro podem produzir citocinas e moléculas pró-inflamatórias em resposta a replicação e componentes bacterianos (Moreillon e Majcherczyk, 2003).

Os receptores do tipo NOD (NLRs) também podem identificar PAMPs do *S. pneumoniae* (Liu et al., 2010). NOD1 e NOD2 reconhecem fragmentos de PGN (constituintes da parede celular bacteriana) de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Chamaillard et al., 2003). Após o reconhecimento do PGN bacteriano, os receptores citosólicos NOD1 e NOD2 recrutam o receptor que interage com a proteína-2 (RIP2), inibidores celulares de apoptose (cIAP2) e inibidor da proteína de apoptose ligada ao X (XIAP). Essa cascata fornece um link para o complexo TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 e o complexo IKK, que fosforilam o IKB, resultando também na liberação e translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B e MAPK, para induzir a transcrição de citocinas como a IL-1 (Kumar et al., 2013). O NF- κ B também atua na expressão do receptor tipo NOD contendo domínio de pirina 3 (NLRP3) (Chen et al., 2020) que é capaz de identificar toxinas bacterianas de construção dos poros, como a Ply (Witzenrath et al., 2011). A Ply pode ativar o NLRP3 que se oligomeriza com um domínio de recrutamento de caspase (ASC) e pró-caspase 1. A procaspase-1 é convertida em caspase-1 ativada, que posteriormente amadurece e secreta as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 em sua forma madura (Schroder et al., 2010) conforme demonstrado na figura 2.

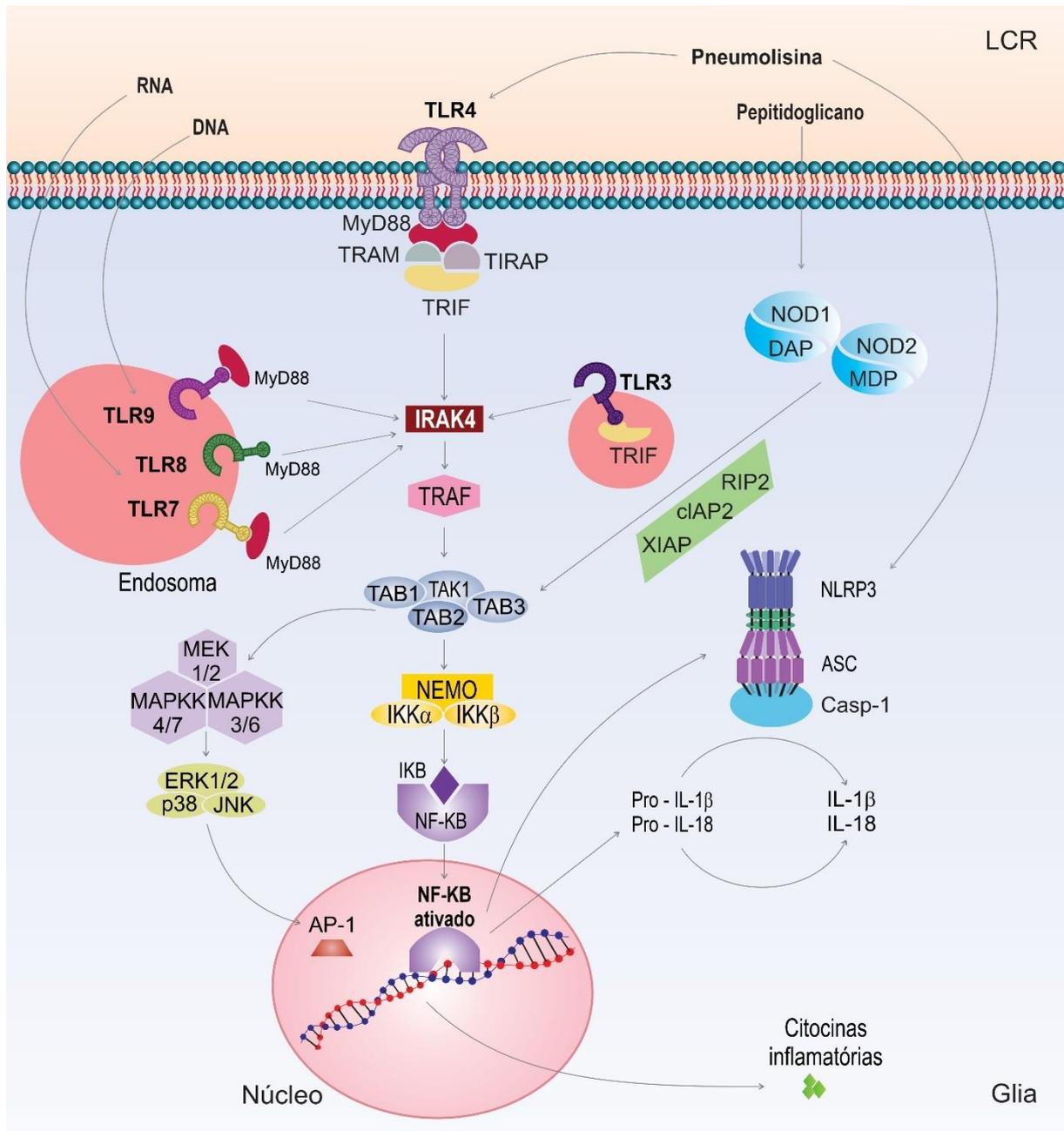


Figura 2: Fisiopatologia da meningite bacteriana. A Ply ativa o TLR4 que forma uma cascata intracelular que induz a translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo promovendo a produção de pró-IL-1 β e pró-IL-18. Esta mesma cascata pode ativar outras proteínas que irão translocar AP-1 para o núcleo, promovendo a produção de citocinas inflamatórias. A Ply também ativa NLRP3 que transforma as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 em sua forma madura. O PGN, por sua vez, ativa receptores intracelulares NOD, que através de outra cascata também promovem a translocação de NF- κ B e AP-1 para o núcleo. O DNA e RNA também ativam receptores do endossoma que podem ativar a mesma cascata, levando à produção de citocinas inflamatórias. Figura elaborada pelo autor.

TNF- α e IL-1 β são importantes citocinas de resposta pró-inflamatória precoce do hospedeiro a uma infecção. Em uma metanálise, os níveis de TNF- α e IL-1 β foram identificados como marcadores úteis na predição de meningite bacteriana (Panato et al., 2014). Estudos demonstram altos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 no LCR de pacientes com meningite (Krebs et al., 2005; Prasad et al., 2014). A

administração de TNF- α ou IL-1 humana recombinante intracerebral em roedores resultou em inflamação e quebra da BHE e essas alterações fisiopatológicas identificadas foram semelhantes às da infecção por meningite bacteriana (Quagliarello et al., 1991; Rosenberg et al., 1995). Já camundongos deficientes em TNF- α submetidos à meningite pneumocócica apresentaram aumento da mortalidade e comprometimento da memória (Gerber et al., 2004).

Estudos histopatológicos documentam uma ampla gama de lesões cerebrais associadas à meningite bacteriana em humanos, incluindo formação de edema cerebral, hidrocefalia, hemorragias petequiais, lesões necróticas nas estruturas corticais e subcorticais e perda de fibras mielinizadas na substância branca (Engelen-Lee et al., 2016). Além disso, um estudo recente de autópsia verificou apoptose hipocampal leve a moderada em 70% dos casos de meningite (Nau et al., 1999). Os mecanismos subjacentes à apoptose do hipocampo não são totalmente identificados, mas, acredita-se que a morte celular apoptótica ocorra através da indução do citocromo-c mitocondrial ou por eventos de sinalização dependentes de fatores indutores de apoptose, dependendo do tempo após a infecção e do patógeno causador (Gerber e Nau, 2010).

1.3 MICROGLIA

As células microgliais são as principais células imunes inatas do SNC, e desempenham um papel importante na regulação da inflamação no cérebro durante condições patológicas (Butovsky e Weiner, 2018). A microglia é classificada como macrófago especializado (Saijo e Glass, 2011) encontrado apenas no SNC, incluindo o cérebro, medula espinhal, retina e bulbo olfatório (Lannes et al., 2017). Elas se distinguem de outras células da glia, como astrócitos e oligodendrócitos, por sua origem, morfologia, padrão de expressão gênica e funções (Ransohoff e Perry, 2009; Kettenmann et al., 2011). Essas células se originam de progenitores primitivos no saco vitelino e migram para o SNC durante o estágio inicial do desenvolvimento embrionário e depois passam para um fenótipo ramificado, examinando constantemente o ambiente para manter sua homeostase (Saijo e Glass, 2011).

Durante um insulto ao SNC de humanos, a microglia ativada se transforma em um fenótipo amebóide e responde ao evento patológico liberando diversas substâncias, incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Wolf et al.,

2017). Compreender a ativação da microglia é essencial, pois estudos sugerem que a ativação da microglia pode promover a neurodegeneração por meio de vários mecanismos (Venneti et al., 2006). Um desses mecanismos pode-se destacar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que afeta ativamente as doenças neurodegenerativas associadas à microglia por meio de seu papel como moléculas pró-inflamatórias e moduladoras de processos pró-inflamatórios (Park et al., 2015).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Em um conceito global, o Estresse oxidativo é definido como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização e controle redox e/ou dano molecular” (Sies, 2007). As ERO são resultado da redução parcial do oxigênio molecular interagindo com moléculas orgânicas e são citotóxicas, podendo induzir a morte celular. Essas moléculas podem ajudar em processos celulares de defesa contra agentes patogênicos (Valko et al., 2007).

O estresse oxidativo é determinado pelo balanço entre a quantidade de ERO geradas e a capacidade dos processos metabólicos de produzir antioxidantes (Halliwell e Whiteman, 2004). Diversos tipos celulares podem sofrer danos oxidativo, no entanto, o SNC é particularmente vulnerável pois utiliza altas taxas de oxigênio quando comparado a outros órgãos, e por possuir uma baixa concentração das defesas antioxidantes (De Menezes et al., 2009).

Em um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, encontram-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase e a catalase (CAT). Enquanto no grupo de antioxidantes não-enzimáticos pode-se destacar o ácido ascórbico, glutathiona e outros.

As ERO são produzidas por células imunes residentes do cérebro durante uma inflamação (Valko et al., 2007). Mitocôndrias isoladas foram identificadas como a principal fonte de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma importante ERO, predominantemente via redução de um elétron para o radical ânion superóxido (Loschen et al., 1971). Uma característica relativa ao desfecho do estresse oxidativo é o início de uma resposta, implementada por meio de interruptores moleculares de redução que iniciam a ativação da expressão gênica para neutralizar o desfecho. O resultado é a manutenção da homeostase redox. Um dos principais “reguladores

mestres” é o sistema NF- κ B/I κ B que após a translocação para o núcleo, ativa a expressão de genes envolvidos nas respostas de fase inflamatória, imunológica e aguda (Schreck et al., 1992).

1.5 PROTEÍNA TRANSLOCADORA MITOCONDRIAL

Nas últimas décadas, a visualização da ativação microglial *in vivo* após um insulto do SNC tem sido possível pela tomografia por emissão de pósitrons (PET), uma técnica de imagem ideal para um diagnóstico precoce e início de tratamentos precisos na neuroinflamação. A detecção não invasiva da inflamação usando imagens PET é demonstrada em um amplo espectro de doenças, incluindo doenças neurodegenerativas (Dupont et al., 2017; Shen et al., 2018) e complicações psiquiátricas, utilizando os ligantes farmacológicos da proteína translocadora mitocondrial (TSPO) (Di Biase et al., 2017; Setiawan et al., 2018).

Anteriormente conhecido como receptor periférico de benzodiazepina (PBR), a TSPO é expressa na membrana mitocondrial externa (Papadopoulos et al., 2006). Ela é expressa em todo o cérebro e extremamente abundante nos tecidos e células sintetizadores de esteróides, como gônadas e células adrenais (Braestrup et al., 1977; Möhler e Okada, 1977; Rupprecht et al., 2010). A TSPO também é expressa em células cardíacas, renais, hepáticas, hematopoiéticas e linfáticas (Davies e Huston, 1981; Anholt et al., 1984; Bond et al., 1985). No SNC, a TSPO é expressa em astrócitos ativados e neurônios de mamífero, predominantemente nas células da microglia, que desempenham um papel importante na neuroinflamação (Anholt et al., 1984; Park et al., 1996).

A TSPO tem sido associada a várias funções, incluindo apoptose, regulação do transporte de colesterol, esteroidogênese, proliferação celular, controle de muitas funções mitocondriais e modulação do sistema imunológico. Um estudo anterior, confirmou um papel da TSPO em processos inflamatórios de tecidos periféricos e no SNC como uma resposta a lesões e doenças; esse papel pode ser passivo, sendo o TSPO o resultado do aumento da biogênese da membrana mitocondrial que ocorre durante a proliferação da microglia, ou ativo, possivelmente através da regulação de ERO e produção local de esteróides (Papadopoulos et al., 2018).

A expressão de TSPO aumenta após o insulto no SNC devido à presença de células inflamatórias infiltrantes e microglia ativada (Raghavendra Rao et al., 2000; Beckers et al., 2018). A TSPO está fortemente associada à inflamação e sua expressão elevada induz o aumento de ERO, TNF- α e IL-1 β (Bourdiol et al., 1991; Rey et al., 2000). Astrócitos expressam altos níveis de TSPO em culturas de células de rato sob condições de hiposmolaridade (Kruczek et al., 2009). Por outro lado, os mecanismos anti-inflamatórios dos ligantes de TSPO poderiam ser explicados com base em sua capacidade de reduzir a ativação da microglia e inibir os fatores de transcrição relacionados à síntese de mediadores pró-inflamatórios (Ma et al., 2016).

A TSPO interage com os canais aniônicos dependentes da tensão (VDACs) para contribuir com o controle e a regulação das estruturas e funções mitocondriais (Mcenery et al., 1992). Assim, a TSPO forma um complexo multimérico com VDACs, que estão localizados na membrana mitocondrial externa e translocadores de nucleotídeos de adenina (ANTs), que estão localizados na membrana mitocondrial interna. Este complexo multiproteico mitocondrial, chamado MPTP, é responsável pela permeabilidade da água e substâncias pequenas na junção das membranas mitocondriais interna e externa (Mcenery et al., 1992; Kinnally et al., 1993). A interação entre as proteínas VDAC e TSPO parece desempenhar um papel na morte celular apoptótica (Veenman et al., 2008). Curiosamente, a ativação de MPTP aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial, o que facilita a indução de oxidação de cardiolipina por ERO (Kovacic et al., 1991; Veenman et al., 2008). A cardiolipina é um fosfolípido predominantemente localizado na membrana mitocondrial interna cujas funções incluem, estabilização da membrana, permitindo o correto funcionamento da cadeia respiratória e está relacionado à liberação do citocromo-c dos espaços intermembranares para o citosol. Por outro lado, o citocromo-c também pode catalisar a cardiolipina, o que facilita a permeabilização da membrana mitocondrial externa; assim, o citocromo-c desempenha um papel pró-apoptótico (Orrenius e Zhivotovsky, 2005; Veenman et al., 2008).

O citocromo-c é um transportador de elétrons que está localizado entre os complexos respiratórios mitocondriais III e IV, e está ancorado na membrana mitocondrial através de interações com fosfolípidos ácidos, particularmente a cardiolipina (Orrenius e Zhivotovsky, 2005). O citocromo-c liga-se ao fator de ativação da peptidase apoptótica 1 (APAF-1). Assim, esse complexo recruta e ativa a pró-caspase-9, que desencadeia a ativação das caspases 3, 6 e 7 (Li et al., 2017). O

citocromo-c também facilita a liberação do fator indutor de apoptose (AIF) e o segundo ativador derivado de mitocôndrias da caspase (SMAC) através do MPTP no citosol (Twiddy et al., 2004). Além disso, o SMAC, é uma proteína mitocondrial que pode promover a ativação da caspase-9 por ligação ao inibidor da proteína de apoptose (IAP) e remoção de sua atividade inibitória, sendo um componente de outra via apoptótica. O SMAC desencadeia a ativação da caspase através da via do citocromo-c/APAF-1/caspase-9 (Du et al., 2000) conforme mostrado na figura 3.

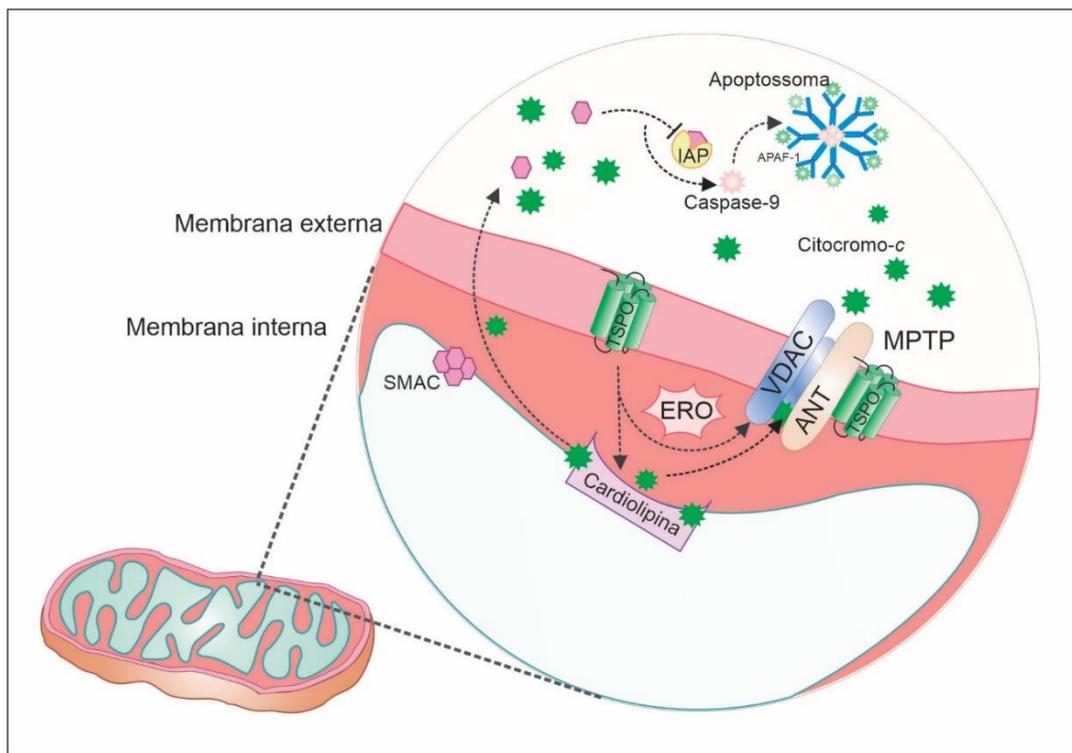


Figura 3: O MPTP atua na via da apoptose. A cardiolipina pode ser oxidada por ERO, que desencadeia a liberação de citocromo-c, permitindo que o citocromo-c entre no citosol e induza a apoptose. O citocromo-c também pode ativar a cardiolipina, o que facilita a liberação de SMAC através do MPTP no citosol. SMAC promove a ativação da caspase-9 ligando-se ao inibidor de IAP e removendo sua atividade inibitória, desencadeando a ativação da caspase na via do citocromo-c/APAF-1/caspase-9. Figura adaptada de Barichello et al., 2017.

O papel neuroinflamatório da TSPO já foi avaliado na doença de Alzheimer (Kreisl et al., 2016), doença de Parkinson (Gerhard et al., 2006), esclerose múltipla (Janssen et al., 2016), lesão cerebral traumática (Papadopoulos e Lecanu, 2009), acidente vascular cerebral isquêmico (Gerhard et al., 2005), demência frontotemporal (Cagnin et al., 2004), vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Zhou et al., 2014) e distúrbios neuropsiquiátricos autoimunes pediátricos associados à infecção estreptocócica (Kumar et al., 2015). Em doenças psiquiátricas, a TSPO teve sua

expressão reduzida em plaquetas de pacientes deprimidos (Sarubin et al., 2016), em células mononucleares periféricas de pacientes ansiosos (Nudmamud et al., 2000) e em membranas plaquetárias de pacientes que sofrem de ansiedade e transtorno bipolar (Abelli et al., 2010).

Embora tenha se passado várias décadas desde que se estabeleceu uma regulação positiva da TSPO durante a neuroinflamação, o papel da TSPO e seus mecanismos de sinalização na regulação da neuroinflamação ainda precisam ser elucidados. Neste ponto, também é importante entender o papel bifásico da TSPO na neuroinflamação e em doenças neuropsiquiátricas. O papel da TSPO na regulação da neuroinflamação e na ativação da microglia induzida por lipopolissacarídeos (LPS) tanto *in vivo* quanto *in vitro* foi investigado e sugere que a queda na expressão de TSPO leva ao aumento da geração de citocinas pró-inflamatórias, como a expressão de TNF e IL-6. Por outro lado, o oposto também ocorreu, com a superexpressão de TSPO, a geração de citocinas pró-inflamatórias foi atenuada quando comparada às células de controle. Os autores explicam que o aumento da expressão de TSPO durante a neuroinflamação pode ser um mecanismo de resposta adaptativa. Assim, este estudo fornece dados experimentais em nível molecular demonstrando que a TSPO é uma proteína reguladora negativa da ativação da microglia e da neuroinflamação (Bae et al., 2014).

Além da neuroinflamação, o papel bifásico da TSPO foi relatado também nos distúrbios neuropsiquiátricos. Uma diminuição nos níveis de RNAm de TSPO foi observada em linfócitos de pacientes com transtorno de ansiedade generalizada, transtorno do estresse pós-traumático e transtorno obsessivo-compulsivo em comparação com controles saudáveis (Dell'osso et al., 2010). Em contraste, os níveis de RNAm de TSPO foram normalizados após tratamentos de ansiedade (Rocca et al., 1993). Em um estudo envolvendo pacientes com fobia social generalizada, a expressão de TSPO nas plaquetas foi menor do que no grupo controle (Johnson et al., 1998). Esse menor nível de densidade de TSPO plaquetária foi evidente em um subgrupo de pacientes bipolares, que também preenchem os critérios para transtorno de ansiedade (Abelli et al., 2010).

Uma profunda compreensão da biologia e função da TSPO, tanto no SNC como no sistema nervoso periférico é importante, podendo ser usados para o diagnóstico e tratamento de distúrbios neurológicos ocasionados por neuroinflamação.

1.6 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços nos cuidados de saúde e na vacinação as taxas de mortalidade por meningite pneumocócica continuam altas, principalmente em países de baixa renda. Um número considerável de sobreviventes apresenta sequelas comportamentais, perda de audição, convulsões, déficits neurológicos, prejuízo de aprendizagem e perda de memória. No entanto, os mecanismos biológicos que desencadeiam essas alterações cognitivas nos pacientes após meningite bacteriana não são totalmente elucidados.

As células gliais, principalmente a microglia, desempenham um importante papel na modulação de processos inflamatórios no SNC. A resposta inflamatória leva a distúrbios metabólicos e alterações na permeabilidade da BHE, permitindo a passagem de mediadores inflamatórios periféricos para o SNC, exacerbando ainda mais o processo neuroinflamatório, podendo levar a uma disfunção neuronal. Essas disfunções neuronais podem acarretar, em longo prazo, alteração funcional e cognitiva em pacientes e em modelos animais de meningite pneumocócica.

Portanto, este trabalho tem como hipótese que uma persistente ativação microglial e uma exacerbação nos níveis de expressão da TSPO podem desempenhar um papel importante no declínio cognitivo em sobreviventes de meningite. A ativação microglial e os níveis de TSPO *in vivo* poderiam ser explorados para avaliar a importância fisiopatológica e diagnóstica em imagem PET. Deste modo, a avaliação *in vivo* da expressão do TSPO com o marcador ^{11}C -PBR28 através da PET poderia ser uma ferramenta útil para clarificar o papel das células da glia no comprometimento cognitivo a longo prazo desencadeado pela meningite pneumocócica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel da ativação microglial e da expressão de TSPO, *in vivo* 24 horas (aguda) e 10 dias (longo prazo), relacionando com os níveis de marcadores de estresse oxidativo, mediadores inflamatórios e marcadores de ativação glial, sob parâmetros cognitivos em um modelo animal de meningite pneumocócica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar os níveis do marcador de TSPO usando PET (^{11}C -PBR28) *in vivo* 24 horas e 10 dias após modelo experimental de meningite pneumocócica.

Avaliar parâmetros de estresse oxidativo/nitrosativo (MPO, TBARS, nitrito/nitrato, proteína carbonila, CAT, SOD) no hipocampo e córtex frontal em 24 horas e 10 dias após modelo experimental de meningite pneumocócica.

Avaliar os níveis de mediadores inflamatórios (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, TNF- α e INF- γ) no hipocampo e córtex frontal em 24 horas e 10 dias após modelo experimental de meningite pneumocócica.

Avaliar a ativação glial através dos marcadores microgliais (IBA-1, CD11B), astrócito (GFAP), oligodendrócito (Oligo) e neuronal (NeuN), no hipocampo e córtex frontal dos grupos 24 horas e 10 dias após modelo experimental de meningite pneumocócica.

Investigar a via mitocondrial regulada pelo TSPO através da expressão de TSPO, VDAC, ANT, cardiolipina, citocromo-c e caspase-3 e 9, no hipocampo e córtex frontal em 24 horas e 10 dias após modelo experimental de meningite pneumocócica.

Avaliar a memória de habituação, memória aversiva e memória de reconhecimento de objetos novos 10 dias após modelo experimental de meningite pneumocócica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiopatologia Experimental, da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil e *The University of Texas Health Science Center at Houston* (UTHealth) Texas, EUA. O estudo foi realizado dentro das diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA para pesquisas utilizando animais. O projeto possui aprovação do comitê de ética, em ambas as Universidades: na UNESC foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA - com o protocolo número 032/2017-1 (Anexo 1); e na UTHealth pelo Comitê Institucional de Bem-Estar Animal do Centro de Medicina e Cuidados Animais laboratoriais - CLAMC do Centro de Ciências da Saúde da UTHealth, TX, EUA sob protocolo AWC-15-0099 (Anexo 2).

3.2 FÁRMACOS E SUBSTÂNCIAS

A indução da meningite pneumocócica foi realizada por uma única injeção intracisternal (i.c.) com uma cepa de *S. pneumoniae*, ATCC (American Type Culture Collection) 6303 proveniente da CCT (Coleção de Culturas Tropical) André Tosello.

Como anestésico foram utilizados cloridrato de cetamina, Vetaset, na dosagem de 6,6 mg/kg e relaxante muscular cloridrato de xilazina, Rompun, na dosagem de 0,3 mg/kg. Ambos foram administrados em conjunto por via intraperitoneal (i.p) uma única vez.

Para que os animais sobrevivam ao modelo de meningite crônica (10 dias) os ratos foram tratados com antimicrobiano ceftriaxona, Rocefin, na dosagem de 100 mg/kg durante 7 dias duas vezes ao dia.

O biomarcador ^{11}C -PBR28 foi preparado no Centro de Câncer MD Anderson no dia do experimento e administrado por uma injeção intravenosa em bolus de ~ 300 μCi em 200 μL de solução salina via veia da cauda uma única vez antes de iniciar a PET.

3.3 MODELO ANIMAL DE MENINGITE PNEUMOCÓCICA

Para este estudo, foram utilizados ratos Wistar machos, adultos com 60 dias de vida, saudáveis, pesando entre 250 e 300 g provenientes do biotério da UNESC ou adquiridos na Charles River para os experimentos realizados na UTHealth. Os animais foram acondicionados em caixas de no máximo cinco indivíduos, com comida e água *ad libitum*, mantidos em ambiente com temperatura de 23 °C +/- 1 °C e umidade relativa entre 55 e 65%, num ciclo de 12 horas claro-escuro (7:00 às 19:00).

Para a indução da meningite, foi cultivado uma cepa de *S. pneumoniae* em 5 mL de Caldo Todd Hewitt BBL™, crescido até a fase logarítmica. No dia da indução a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm e suspendida em salina estéril até chegar a uma concentração de 5×10^9 unidades formadoras de colônias por mL (UFCol/mL) (Barichello et al., 2013).

Para a inoculação bacteriana os animais foram devidamente anestesiados com uma administração i.p. de cloridrato de cetamina (6,6 mg/kg) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg). Os mesmos foram alocados com cuidado no estereotáxico e submetidos a uma injeção i.c. com agulha calibre 23 de acordo com o seu grupo experimental. Foi inoculado 10 µL de LCR artificial estéril (grupo controle) ou um volume equivalente de suspensão da bactéria (grupo meningite). Logo após a indução foi realizado a reposição volêmica com solução de NaCl a 0,9% (10 mL/Kg) e os animais foram devolvidos ao biotério em suas respectivas caixas.

Para que os animais sobrevivam ao modelo de meningite crônica (10 dias) os ratos foram tratados com antimicrobiano ceftriaxona (100 mg/kg i.p) durante 7 dias, duas vezes ao dia, tendo início 18 horas após a indução (Barichello et al., 2013). A meningite foi confirmada por uma cultura quantitativa de 5 uL de LCR, a 35 °C com 5% de CO₂ em ágar sangue de carneiro (Simoies et al., 2017), obtidos por uma punção da cisterna magna 18 horas após a inoculação.

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

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Neste trabalho, os animais foram divididos em dois protocolos, um agudo 24 horas e um crônico 10 dias. Em cada um dos protocolos os animais foram separados em dois grupos, controle e meningite. No protocolo 24 horas os animais foram submetidos a imagens PET/CT, logo após foram eutanasiados, em as estruturas hipocampo e córtex frontal dissecadas e armazenadas em um freezer a temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores testes bioquímicos, através de ensaio multiplex, *Western blotting* e *Kit* ELISA, outros animais independentes foram utilizados para análise dos parâmetros de estresse oxidativo e mais um grupo de animais independentes que foram perfundidos para análise imunohistoquímica.

Já no protocolo 10 dias os animais foram submetidos a tarefas comportamentais de habituação ao campo aberto, reconhecimento de objetos novos e esQUIVA INIBITÓRIA antes de serem submetidos a PET/CT. Após a análise de PET os animais foram submetidos a eutanasia, e as estruturas hipocampo e córtex frontal armazenados em um freezer a temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores testes bioquímicos, através de ensaio multiplex, *Western blotting* e *Kit* ELISA, outro grupo independente de animais, para análise dos parâmetros de estresse oxidativo e outro grupo independente de animais foram perfundidos para análise imunohistoquímica.

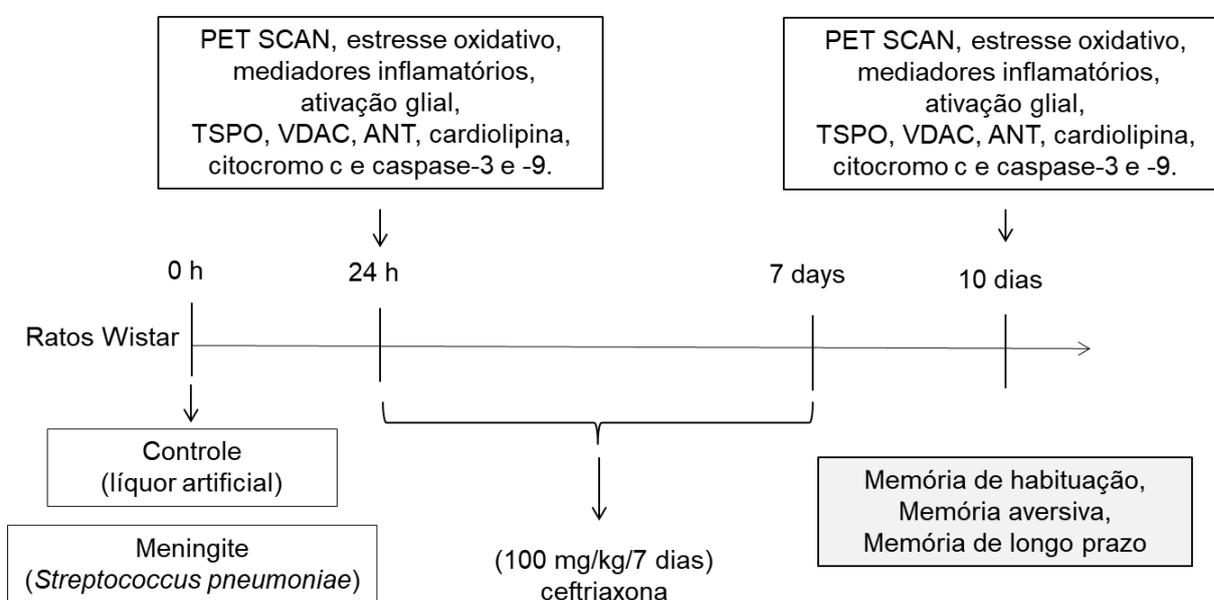


Figura 4: Delineamento experimental. Figura elaborada pelo autor.

3.5 PET/TC SCANNER

Ratos do grupo controle e ratos do grupo meningite dos protocolos de 24 horas e 10 dias foram submetidos a imagens PET seguida por uma Tomografia Computadorizada (TC). Todos os ratos foram anestesiados e manipulados de acordo com as diretrizes do departamento do MD Anderson da Universidade do Texas. A imagem PET foi realizada em um scanner Bruker Albira PET/SPECT/TC dedicado para pequenos animais (Bruker Biospin Corp., Billerica, MA, EUA) com 10 cm e um campo de visão (FOV) axial de 12 cm e FOV transaxial, respectivamente.

A aquisição da imagem PET no modo de lista foi iniciada concomitantemente com uma injeção intravenosa em bolus de ~ 300 μ Ci de ^{11}C -PBR28 em 200 μ L de solução salina via veia da cauda. A PET foi realizada por 20 minutos, seguida por uma CT (400 μ A, 45 kV, 120 projeções) da cabeça e do tronco para correção da atenuação e registro de imagens.

Os dados do modo de lista foram agrupados em quadros dinâmicos: 15 x 20 s, 5 x 60 s e 2 x 300 s. As imagens PET foram reconstruídas usando o método de maximização da expectativa de máxima verossimilhança (MLEM) com 12 iterações. Correções de dispersão, aleatória, decadência e atenuação foram aplicadas. A análise foi realizada com Pmod (PMOD Technologies Ltd., Zurique, Suíça). O volume médio de captação padrão (SUV) - peso corporal (g/mL) de todo o cérebro e tecido muscular normal foram medidos (Toth et al., 2015).

3.6 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

3.6.1 Parâmetros de estresse oxidativo/nitrosativo

3.6.1.1 Concentração de nitrito/nitrato

As amostras de tecidos foram homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato 0,1 M gelado (pH 7,4). Uma alíquota de homogenato foi centrifugada a 10.000 rpm por 8 min com ácido tricloroacético (TCA) a 50% para desproteínização da amostra. A concentração de nitrito/nitrato foi analisada espectrofotometricamente usando reagentes de Griess [1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% e 0,1% de dicloridrato de N-1-nafiletiletlenodiamina em H₂O destilado (solução NED)] e cloreto

de vanádio (III). Uma curva padrão foi executada simultaneamente com cada conjunto de amostras e a densidade óptica foi medida espectrofotometricamente a 550 nm (OD 550) (Green et al., 1982). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

3.6.1.2 Atividade de mieloperoxidase (MPO)

As amostras de tecidos foram homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato 0,1 M gelado (pH 7,4) e brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). Os homogenatos foram centrifugados a 15.000 rpm por 15 min a 4 °C e foi utilizada uma alíquota de sobrenadante que foi misturada com uma solução de tetrametilbenzidina 1,6 mM (TMB) e H₂O₂ 1 mM. A atividade de MPO foi medida espectrofotometricamente a 650 nm a 37 °C (De Young et al., 1989). Os resultados foram expressos em mU/mg de proteína.

3.6.1.3 Peroxidação lipídica

Como índice de dano oxidativo aos lipídios, foi verificado a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em uma reação de aquecimento ácido. As amostras de tecidos foram homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato 0,1 M gelado (pH 7,4). Uma alíquota de homogenato foi centrifugada a 1.000 rpm por 10 min com ácido tricloroacético (TCA) a 10% para desproteinização. O sedimento foi descartado e alíquotas de sobrenadantes foram separadas e utilizadas para determinação do dano oxidativo lipídico. O TBARS foi determinado pela absorvância a 535 nm, usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo (Draper e Hadley, 1990). Os resultados foram expressos em equivalentes de malondialdeído (MDA) nmol/mg de proteína.

3.6.1.4 Formação de proteínas carbonil

As amostras de tecidos foram homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato 0,1 M gelado (pH 7,4). Os homogenatos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C e os sobrenadantes foram utilizados para a determinação do dano oxidativo da proteína. Resumidamente, as proteínas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético a 20% e foram dissolvidas em dinitrofenil-hidrazona, e a absorvância

foi lida a 370 nm (Levine et al., 1990). Os resultados foram expressos como carbonilação de proteína nmol/mg de proteína.

3.6.1.5 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

As amostras de tecidos foram homogeneizadas em 1 ml de tampão glicina (pH 10,2). Os homogenatos foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes utilizados. A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada usando um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação da epinefrina em adrenalina dependente de superóxido para adrenocromo a 32 ° C. A absorção foi medida a 480 nm (Bannister e Calabrese, 1987). A atividade específica da SOD foi representada como mU/mg de proteína.

3.6.1.6 Atividade de Catalase (CAT)

As amostras de tecidos foram homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato 0,1 M gelado (pH 7,4). Os homogenatos foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 min a 4 °C. O sedimento foi descartado e alíquotas de sobrenadantes foram separadas e usadas para determinação da catalase. A atividade de CAT (EC 1.11.1.6) foi avaliada medindo-se a diminuição da absorvância a 240 nm em um meio de reação contendo H₂O₂ 20 mM, Triton X-100 a 0,1%, tampão de fosfato de potássio a 10%, pH 7,0 e sobrenadantes contendo 0,1 - 0,3 mg proteína/mL (Aebi, 1984). A atividade específica foi expressa em mU/mg de proteína.

3.6.2 Análise por imunotransferência

3.6.2.1 Determinação de proteínas

Os resultados foram normalizados pelo teor de proteínas seguindo o método de Lowry usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A absorbância foi lida a 700 nm e os resultados foram expressos em mg de proteína (Lowry et al., 1951).

3.6.2.2 Isolamento de mitocôndrias

O isolamento mitocondrial foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (catálogo nº 89801, Thermo Scientific™, EUA). Resumidamente, o tecido (50-200 mg) foi rompido usando um homogeneizador em tampão fosfato-salino (PBS) e depois centrifugado a 1000 × g por 3 minutos a 4 °C. O sedimento foi suspenso em 800 µl de solução de BSA / reagente A e a suspensão foi agitada em vórtex a uma velocidade média por 5 segundos e incubada em gelo por exatamente 2 minutos. Em seguida, 10 µl de reagente de isolamento de mitocôndrias B foram adicionados e agitados no vórtex na velocidade máxima por 5 segundos. Aproximadamente 800 µl de reagente de isolamento de mitocôndrias C foram adicionados ao tubo, que foi invertido várias vezes e depois centrifugado a 700 × g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi centrifugado a 3.000 × g por 15 minutos a 4 °C. O sedimento mitocondrial foi coletado e lavado.

3.6.2.3 Análise de Western blotting

A análise de *Western blotting* foi realizada de acordo com os protocolos de estudos anteriores (Dandekar et al., 2017). Cada região do córtex frontal e hipocampo do cérebro de rato foi descongelada e homogeneizada usando comprimidos de *Cocktail* Inibidor Completo de Protease (Roche, Diagnostics, IN, EUA). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. As concentrações de proteína no plasma tecidual foram determinadas usando o método de ensaio com ácido bicinonínico (BCA). Para a transferência de western blot, quantidades iguais de proteína (30-50 µg, conforme recomendado para cada anticorpo) para cada amostra foram carregadas em géis pré-fabricados Mini-Protean TGX (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

As proteínas foram transferidas para membranas de polivinilideno difluoreto (PVDF) usando um sistema Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Em seguida, as membranas de PVDF foram bloqueadas com leite seco desnatado a 5% (Bio-Rad) em solução salina tamponada com Tris mais tampão Tween 20 a 0,1% (TBST, Bio-Rad, Califórnia, EUA) por 1 hora à temperatura ambiente e mantido durante a noite em uma sala fria em um agitador com anticorpos primários.

Os anticorpos primários utilizados nas frações mitocondriais foram TSPO (1: 500, LS Bio), VDAC (1: 1000, Thermo) e ANT (1: 1000, Abcam). Os anticorpos primários utilizados no homogeneizado de tecido foram GFAP (1: 1000, Abcam), CD 11B (1: 1000, Abcam), IBA-1 (1: 1000, Abcam), anti-oligodendrócito (Oligo, 1: 1000, Abcam), NeuN (1: 1000, Abcam) e citocromo-c (1: 1000, Abcam).

No dia seguinte, as transferências foram lavadas três vezes em TBST e incubadas com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano silvestre (1: 10000) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após três lavagens finais de 10 minutos cada uma com TBST, as bandas foram detectadas usando quimioluminescência aprimorada (Substrato Clarity Western ECL; Bio-Rad, Califórnia, EUA) com o sistema de imagem de transferência de imagens ChemiDoc MP (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Após a imagem, as manchas foram incubadas no tampão de remoção (Thermo Fisher Scientific; 46430, IL, EUA) por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente, seguida de três lavagens com TBST. As manchas foram incubadas em solução bloqueadora (leite desnatado a 5% em TBST) por 1 hora e depois incubadas com o anticorpo primário direcionado contra β -tubulina (1: 5000, Abcam) ou COX IV (1: 5000, Abcam) como um controle de carregamento. A análise densitométrica de cada proteína foi realizada usando o software Image Lab TM (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos como a razão entre o controle de carregamento e a proteína alvo (Dandekar et al., 2017).

3.6.3 Ensaio multiplex para quantificação de citocinas

Os níveis de citocina e quimiocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, TNF- α e INF- γ foram testados usando kits de imunoenensaio fluorescente multiplex (Ensaio Bio-Plex Pro TM para citocina de rato 14-Plex). A plataforma xMAP usada aqui foi baseada nas esferas fluorescentes do medicamento baseado em regras (RBM) e nos pares de anticorpos. Estes são reagentes sensíveis, específicos e amplamente utilizados, provenientes de vários fabricantes, e os dados coletados usando esferas multiplex xMAP foram amplamente divulgados na literatura em estudos nos quais várias proteínas são testadas simultaneamente.

Os lisados de tecido foram preparados de acordo com as instruções fornecidas pelo kit de lise Bio-Plex Cell (# 171304011) com um coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seguido de centrifugação a 4 °C por 10

minutos a 10000 x g. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços e poliestireno de fundo redondo. Inicialmente, uma alíquota de 50 µL da mistura de esferas de trabalho foi transferida para os poços e a placa foi lavada 2 vezes adicionando 100 µL de tampão de ensaio em cada poço. Depois disso, 50 µL do extrato padrão, controle ou total foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada em um agitador de placas (850 rpm) no escuro à temperatura ambiente por 60 minutos. A placa foi então colocada no separador magnético e incubada para separação por 60 segundos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido de cada poço por inversão manual. As placas foram lavadas 3 vezes adicionando 100 µL de tampão de ensaio em cada poço para garantir a ausência de quaisquer anticorpos indesejáveis ou não específicos.

Após esse protocolo, 25 µL de um anticorpo de detecção foram adicionados a cada poço. A incubação foi novamente conduzida no escuro e à temperatura ambiente em um agitador de placas (850 rpm) por 30 minutos, e a lavagem foi realizada como descrito anteriormente. Finalmente, 50 µL de estreptavidina-PE foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada em um agitador de placas (850 rpm) no escuro à temperatura ambiente por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido após separação magnética das esferas por inversão manual e a lavagem foi realizada como descrito anteriormente. Foi adicionado tampão de ensaio (125 µL) a cada poço, e a placa foi colocada em um agitador de placas por aproximadamente 30 segundos para obter uma agitação suave das esferas. As amostras foram executadas em duplicata usando um sistema Bio-Plex (Bio-Plex 200 Systems, BioRad, Hercules, CA), e a análise dos dados foi realizada no Bio-Plex Manager 4.0 usando um modelo de regressão logística de 5 parâmetros (Scaini et al., 2017).

3.6.4 Imunofluorescência

Esta técnica permite a detecção simultânea de anticorpos contra diversos antígenos bioquimicamente diferentes em um único substrato. A imunofluorescência é utilizada para marcar simultaneamente, anticorpos diferentes nas mesmas células. Isso se faz necessário para saber se a microglia está ativada e qual fenótipo ela está expressando.

Os ratos dos grupos 24 horas e 10 dias, foram devidamente anestesiados e perfundidos transcárdialmente com PBS seguido de paraformaldeído a 4% para fixar o cérebro. Para o ensaio de imunofluorescência (IF), o cérebro foi fixado em solução de formaldeído tamponado a 4% e incorporado em temperatura ideal de corte. Após 24 h, as secções foram cortadas a 8 μ m de espessura usando um criostato a -20°C (Jung Histoslides 2000R, Leica, Heidelberg, Alemanha). Um total de 20-30 fatias por rato foram recuperados e colocados em PBS contendo 0,1% de triton x 100. As fatias foram incubadas em BSA a 3% e soro de cavalo durante 2 horas para bloquear ligações não específicas. As seções foram incubadas com IBA-1 (1: 1000, Wako) e GFAP (1: 1000, Abcam) durante 48 h a 4°C .

Os anticorpos foram diluídos em PBS contendo 2% de albumina de soro bovino. Após quatro lavagens com PBS a 0,1%, fatias de tecido foram incubadas com anticorpos secundários de cabra anti-coelho, Alexa Fluor Plus 488 (1: 1000, Invitrogen, A13201) e para colorir os núcleos, o verde conjugado secundário (Alex 488) e azul (DAPI) foram aplicados para cada seção. Para garantir a marcação no experimento, foi realizado os controles de anticorpos primários, controles secundários de anticorpos e controles de etiqueta. Após a incubação com anticorpos secundários durante 1 h à temperatura ambiente ($21\pm 3^{\circ}\text{C}$), as fatias foram lavadas várias vezes em PBS a 0,1%, e transferidas para lâminas gelatinizadas, montadas com FluorSave™ (345789- Merck Millipore, MA, EUA) e coberto com lamínulas. As seções de tecido foram fotografadas usando a plataforma de microscopia de varredura a laser confocal Leica TCS SP8 e o software *ImageJ* para contar o número de células de imagens confocais.

3.6.5 ELISA

Os ensaios para caspase-3 (MBS018987), caspase-9 (MBS088765) e cardiolipina (MBS721201) foram realizados usando um kit ELISA. As estruturas foram homogeneizadas em solução de extração (100 mg de tecido por 1 mL) contendo: 0,4 mol/L de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de BSA, 0,1 mmol/L de fluoreto de fenil metil sulfonil, 0,1 mmol/L de cloreto de benzetônio, 10 mmol/L de EDTA e 20 de KI a aprotinina, utilizando Ultra-Turrax (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). As estruturas cerebrais já homogeneizadas foram centrifugadas a 3000 x g durante 10 min a 4°C , e os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -20°C . Os sobrenadantes do

tecido cerebral foram dosados em uma configuração de ELISA utilizando anticorpos comercialmente disponíveis (Lowry et al., 1951).

3.7 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

3.7.1 Habituação ao campo aberto

Para avaliar as atividades locomotoras e exploratórias dos animais foi usado o aparato de campo aberto. O aparelho é um campo aberto de 40 cm de profundidade por 60 cm de largura, cercado por paredes cinza escuras de 50 cm de altura com uma parede de vidro frontal. Linhas pretas dividem o chão do campo aberto em nove retângulos. Cada rato foi gentilmente colocado no quadrante traseiro esquerdo do campo aberto e foi permitido explorar a arena por 5 minutos (sessão de treinamento; dia 9). Foram medidos o número de cruzamentos (o número de vezes que o animal cruzou as linhas pretas) e os movimentos de levantamentos (se apoiou com as patas traseiras levantando as dianteiras). Imediatamente após este procedimento, os animais foram devolvidos à sua gaiola. Vinte e quatro horas após a sessão de treinamento, foi realizado a sessão de teste. Todos os ratos foram submetidos a uma segunda sessão de campo aberto (dia 10). Em ambas as sessões, os cruzamentos e os levantamentos foram contados pelo período de 5 minutos. Uma redução no número de cruzamentos e levantamentos nas duas sessões foi tomada como uma medida de retenção de memória (Vianna et al., 2000).

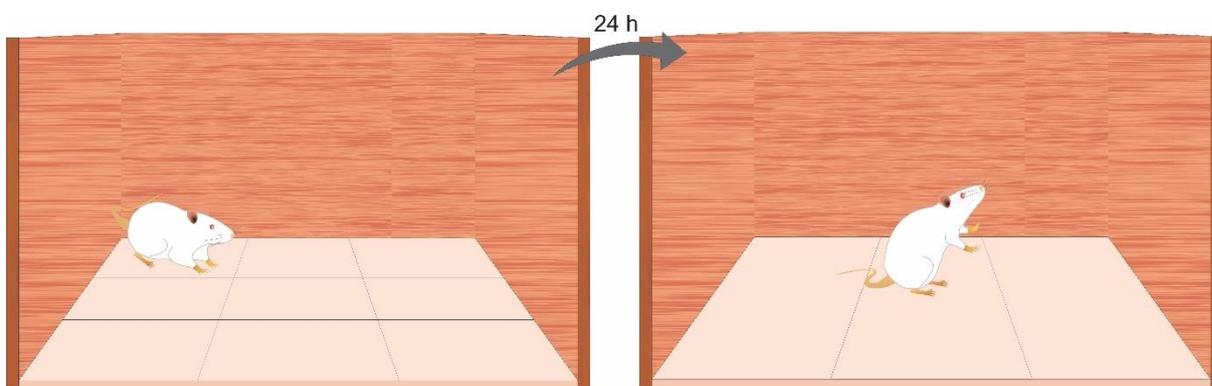


Figura 5: Representação do teste de habituação ao campo aberto.

3.7.2 Teste de reconhecimento de objetos novos

Oito dias após a indução da meningite, os ratos foram submetidos a um teste de reconhecimento de objetos novos no mesmo aparato aberto (60 x 40 cm) cercado por paredes cinza escuro e frente de vidro de 50 cm de altura. Este primeiro dia foi dedicado a uma sessão de habituação onde o animal foi colocado cuidadosamente no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho e foram autorizados a explorar o ambiente livremente por 5 minutos. No dia 9 (segundo dia de teste), os ratos foram expostos a dois objetos idênticos por um período de 10 minutos e foi contado o tempo que o animal explorará cada objeto. Os objetos utilizados neste experimento foram caixas quadradas de madeira (mesma cor). As alturas dos objetos foram comparáveis e pesadas o suficiente para garantir que não sejam deslocadas pelos animais. No dia seguinte (dia 10), uma das caixas quadradas de madeira foi substituída por um novo objeto e o rato foi autorizado a explorar os objetos novos e familiares na caixa de teste por 5 minutos (tentativa de retenção). O índice de reconhecimento foi calculado para cada animal e foi relatado como a razão $TB/(TA + TB)$ (TA = tempo gasto explorando o objeto familiar, A; TB = tempo gasto explorando o novo objeto, B) (Idris et al., 2010).

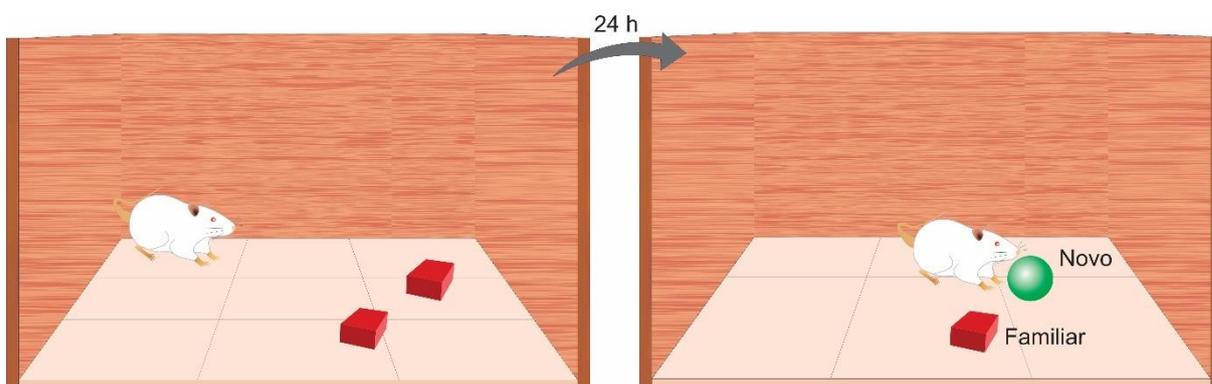


Figura 6: Representação do teste de reconhecimento de objetos novos.

3.7.3 Esquiva inibitória

As dimensões da caixa de acrílico usada para testar a esquiva inibitória é de 50 x 25 x 25 cm (Albarsch, Porto Alegre, Brasil). O piso é feito de barras paralelas de aço inoxidável (1 mm de diâmetro) com espaçamento de 1 cm entre elas. Uma plataforma de 7 cm de largura e 2,5 cm de alturas foi colocada no chão da caixa contra a parede esquerda. Durante a sessão de treinamento (dia 9), os animais foram

colocados na plataforma e sua latência para descer com as quatro patas na grade foi medida. Imediatamente após pisar na grade, os animais receberão um choque de 0,4 mA durante 2,0 segundos e foram devolvidos à sua gaiola. Uma nova sessão ou sessão teste foi realizado 24 horas após o treinamento (dia 10). O teste de retenção foi idêntico ao teste de treinamento, exceto que nenhum choque foi dado. O tempo de latência para descer a plataforma (máximo, 180 segundos) foi usado como uma medida de retenção de memória inibitória (Bernabeu et al., 1997).

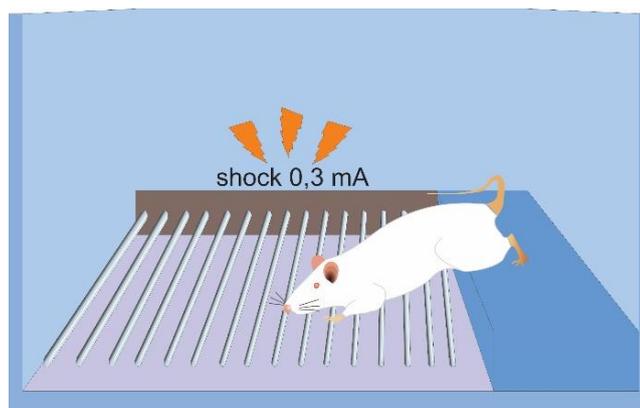


Figura 7: Representação do teste de esqui inibitória.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e para homogeneidade usando o teste de Levene. Quando os dados foram normais e homogeneidade de variância confirmada, foram utilizados testes paramétricos; quando os dados não cumpriram estas condições, foram utilizados os testes não paramétricos. Dados da tarefa de habituação ao campo aberto foram relatados como média \pm erro padrão da média (EPM), e as comparações dentro dos grupos foram feitas utilizando-se teste t de Student pareado. Dados da tarefa de esqui inibitória e reconhecimento de objetos novos foram expressos pela média \pm intervalo interquartil realizados pelo teste U-Mann-Whitney. As comparações dentro dos grupos foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. Para todas as análises, os resultados foram expressos como a média \pm EPM. Os grupos de todas as análises bioquímicas foram analisadas por teste t de Student pareado. Os resultados estatisticamente significativos foram indicados por $P < 0,05$. Todas as análises

estatísticas foram realizadas usando graphpad prisma 7.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Califórnia, EUA).

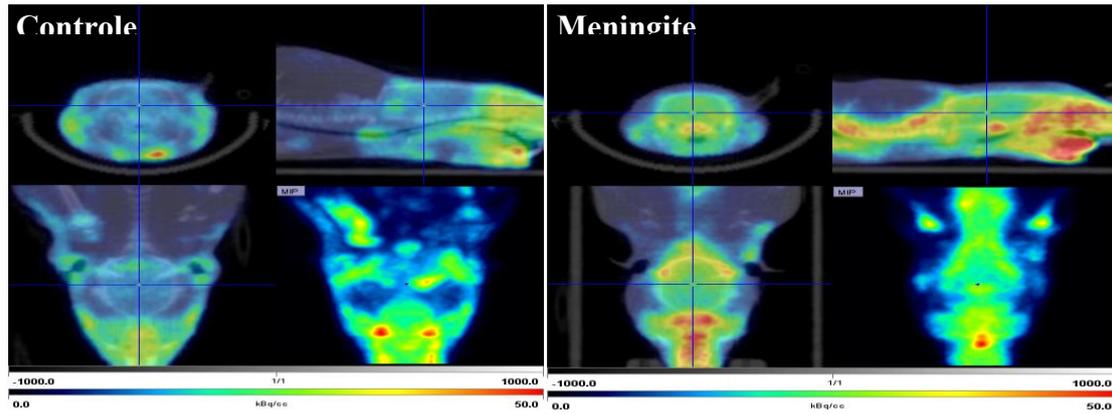
4 RESULTADOS

4.1 AUMENTO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL

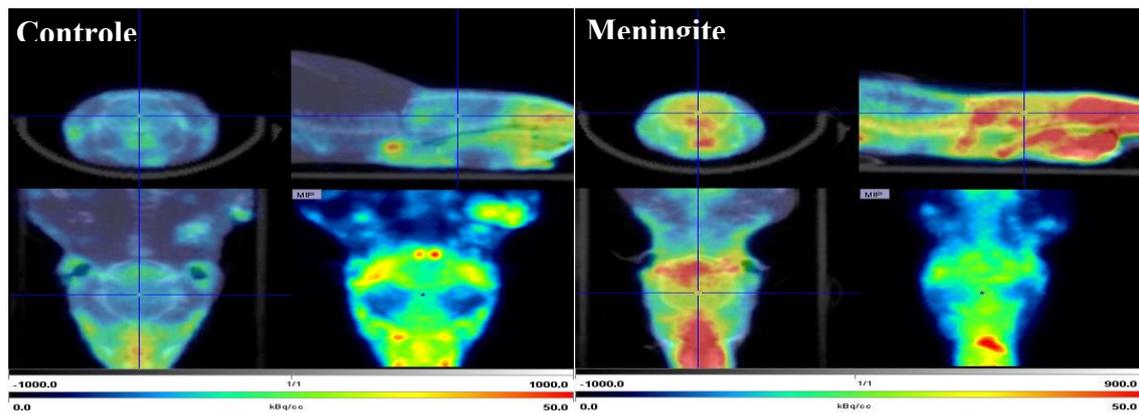
Para investigar se a microglia é ativada durante a meningite aguda, os animais foram submetidos a um marcador para a proteína TSPO em análise de PET, o ^{11}C -PBR28, que tem sido amplamente utilizado para investigações pré-clínicas e clínicas (Zurcher et al., 2015; Albrecht et al., 2016). Os grupos de 24 horas e 10 dias foram submetidos a uma varredura TSPO-PET seguida por imagens de TC. O valor de absorção padronizado (SUV) foi calculado usando a seguinte fórmula: $\text{SUV} = r/(a'/w)$, onde r é a concentração de radioatividade expressa em kBq/ml, medida pelo scanner PET dentro de uma região de interesse (ROI); a' é o traçador radiomarcado injetado (com correção de decaimento) expresso como kBq; e w é o peso do animal.

Conforme mostrado na figura 8, a captação cerebral de ^{11}C -PBR28 foi significativamente aumentada em ratos, 24 horas ($P < 0,05$) e 10 dias ($P < 0,01$) após a indução da meningite. O aumento na captação de ^{11}C -PBR28 sugere uma expressão exacerbada de TSPO, demonstrando um aumento da ativação microglial após meningite experimental. A ativação microglial persistente estava presente, conforme demonstrado pelo aumento da captação do radiotraçador mesmo após 10 dias, quando os animais estavam livres da infecção.

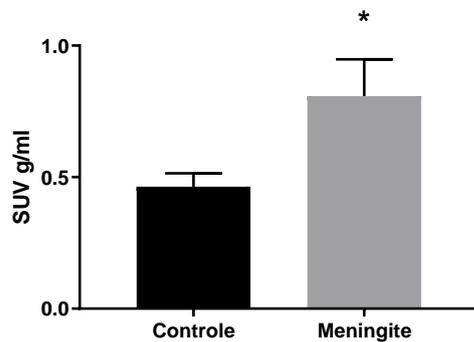
A



B



C



D

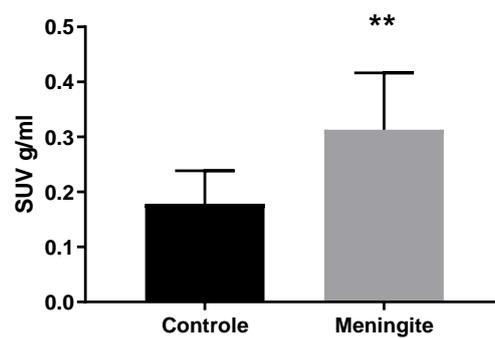


Figura 8: Imagem PET *in vivo* de TSPO usando ^{11}C -PBR28. Imagens somadas representativas da reconstrução dinâmica de imagens PET/CT adquiridas simultaneamente de ratos Wistar machos adultos submetidos a meningite experimental e seus respectivos controles, 60 minutos após a injeção intravenosa de ^{11}C -PBR28. As orientações coronal, sagital e dorsal do cérebro são apresentadas, mostrando aumento da captação do cérebro ^{11}C -PBR28 no modelo experimental de meningite quando comparado aos controles. **A** - Vinte e quatro horas após a indução experimental da meningite. **B** - Dez dias após a indução experimental da meningite. A escala SUV representa o valor de absorção padronizado (SUV). Quantificação de ^{11}C -PBR28 detectada no modelo experimental de meningite foi significativamente maior do que nos controles com base nas medidas do cérebro/músculo. **C** - SUV 24 h após a indução experimental da meningite. **D** - SUV 10 dias após a indução experimental da meningite. Os resultados são expressos como a média \pm SEM para $n = 5-8$ ratos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ em comparação com os controles.

4.2 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Neste estudo, o dano oxidativo no córtex frontal e no hipocampo foi avaliado nos grupos de 24 horas e 10 dias. Conforme mostrado na figura 9, não foi encontrado mudanças significativas na atividade de MPO tanto no córtex frontal quanto no hipocampo, nos grupos de 24 horas e 10 dias. No entanto, foi observado um aumento significativo no marcador de peroxidação lipídica, TBARS, mostrando níveis elevados no córtex frontal ($P < 0,01$) e hipocampo ($P < 0,05$) no grupo com meningite 10 dias em comparação com o grupo controle. No córtex frontal, as concentrações elevadas de nitrito/nitrato e níveis de proteína carbonil ($P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente) foram observados em ambos os grupos de 24 horas e 10 dias. Já no hipocampo, apenas o grupo meningite 24 horas demonstrou concentrações elevadas de nitrito/nitrato ($P < 0,05$), mas nenhuma mudança significativa foi observada no grupo 10 dias para concentrações de nitrito/nitrato ou níveis de proteína carbonil. Como esperado, o grupo meningite apresentou diminuição da atividade de CAT no córtex frontal tanto no em 24h ($P < 0,01$) quanto em 10 dias ($P < 0,05$). Enquanto no hipocampo, apenas o grupo meningite em 10 dias apresentou uma diminuição significativa na atividade da CAT ($P < 0,001$). A atividade da SOD, uma outra enzima antioxidante, também diminuíram no córtex frontal no grupo meningite em 24 horas ($P < 0,001$) e 10 dias ($P < 0,001$). E foi encontrado atividade diminuída de SOD apenas no hipocampo dos animais do grupo de 10 dias ($P < 0,01$) (figura 9).

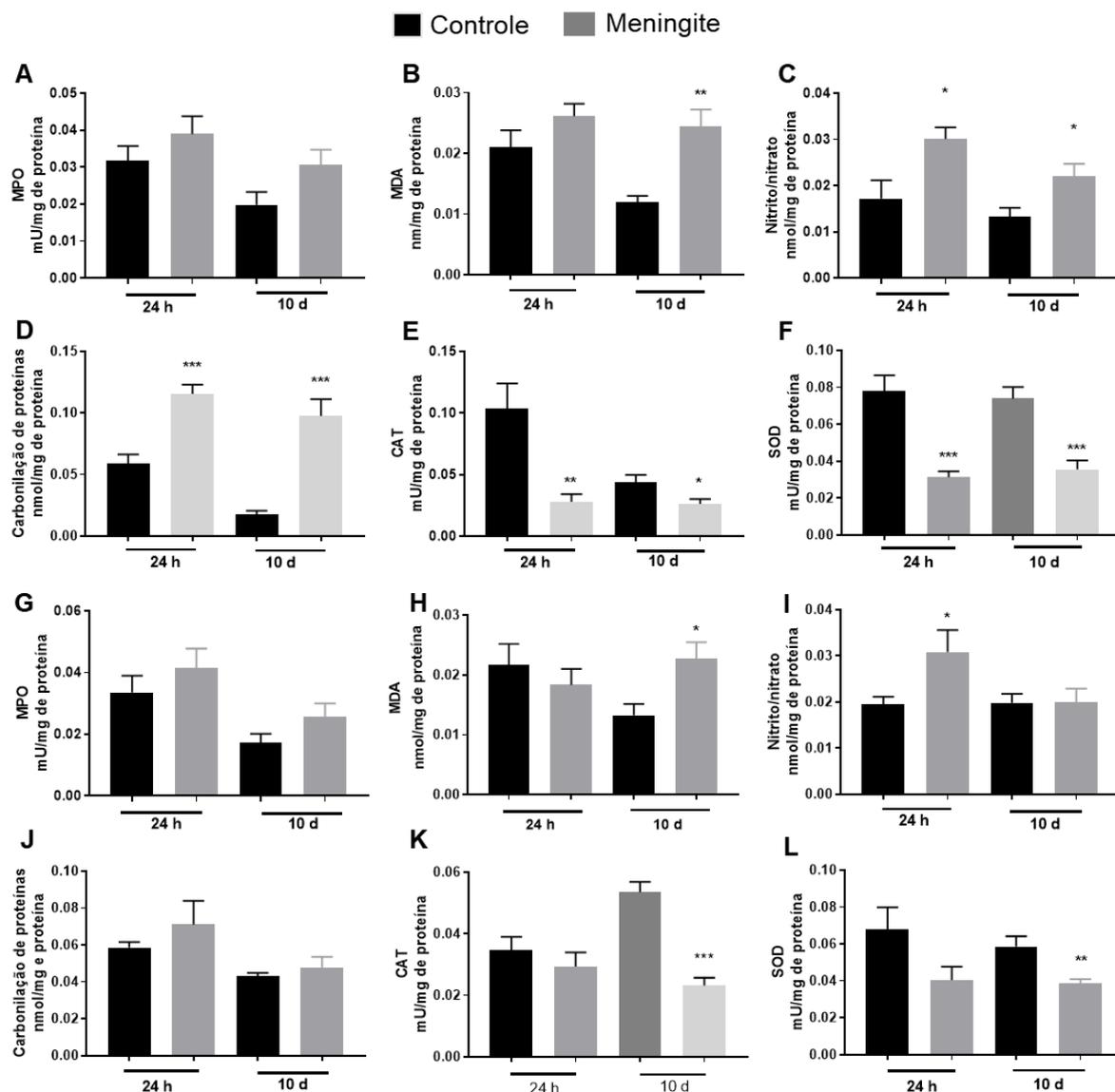


Figura 9: Estresse oxidativo elevado e defesa enzimática reduzida após meningite experimental. Níveis de **A** MPO, **B** TBARS, **C** nitrito/nitrato, **D** proteína carbonila, **E** CAT e **F** SOD no córtex frontal de animais com meningite experimental e controle 24h e 10 dias após a indução da meningite. Níveis de **G** MPO, **H** TBARS, **I** nitrito/nitrato, **J** proteína carbonila, **K** CAT e **L** SOD no hipocampo de animais com meningite experimental e controle 24h e 10 dias após a indução da meningite. Os resultados são expressos como a média \pm SEM para $n=6$ ratos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ em comparação com os controles.

4.3 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

A primeira linha de defesa em resposta à invasão bacteriana de *S. pneumoniae* durante a meningite é alcançada pela resposta imune do hospedeiro e pela produção de mediadores inflamatórios (Scheld et al., 2002). Anteriormente, foi relatado em um estudo cinético da liberação de citocinas e quimiocinas após

meningite experimental (Barichello et al., 2011). No estudo atual, 24 horas e 10 dias após a meningite, a expressão de citocinas e quimiocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, TNF- α e INF- γ) foi avaliada usando o ensaio Multiplex (Tabelas 1 e 2). Como esperado, no córtex frontal, foram observados níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α e INF- γ (P<0,05) e diminuição dos níveis de IL-7, IL-10 e IL-13 (P <0,05) no grupo com meningite de 24 horas (Tabela 1). No hipocampo, foram observados níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α e INF- γ (P <0,05) no grupo meningite 24 horas (Tabela 1).

Embora o LCR tenha resultado negativo para microrganismos (dados não mostrados) 10 dias após a infecção, os níveis de TNF- α (P <0,05) ainda estavam elevados no córtex frontal em comparação com os respectivos grupos controle, com diminuição simultânea de IL-12 e IL-17 (P <0,05) (Tabela 2). Também foi observado níveis aumentados de IL-4 (P < 0,05) e níveis diminuídos de IL-17 (P < 0,05) no hipocampo de ratos com meningite, 10 dias após a infecção (Tabela 2).

Citocinas (pg/ μ g)	Córtex pré-frontal 24h		Hipocampo – 24h	
	Controle	Meningite	Controle	Meningite
IL-1α	0,018 \pm 0,001	0,711 \pm 0,222*	0,014 \pm 0,001	0,199 \pm 0,020*
IL-1β	0,165 \pm 0,009	1,569 \pm 0,256*	0,107 \pm 0,008	0,267 \pm 0,027*
IL-4	0,009 \pm 0,001	0,007 \pm 0,001	0,005 \pm 0,0004	0,005 \pm 0,0009
IL-5	0,052 \pm 0,003	0,046 \pm 0,001	0,034 \pm 0,002	0,315 \pm 0,003
IL-6	0,077 \pm 0,005	0,984 \pm 0,030*	0,059 \pm 0,005	0,447 \pm 0,050*
IL-7	0,010 \pm 0,0007	0,007 \pm 0,0008*	0,003 \pm 0,0002	0,002 \pm 0,0008
IL-10	0,033 \pm 0,004	0,019 \pm 0,001*	0,022 \pm 0,001	0,023 \pm 0,001
IL-12	0,013 \pm 0,001	0,006 \pm 0,008	0,009 \pm 0,001	0,009 \pm 0,0008
IL-13	0,027 \pm 0,001	0,012 \pm 0,0008*	0,012 \pm 0,008	0,011 \pm 0,001
IL-17	0,021 \pm 0,002	0,041 \pm 0,001*	0,011 \pm 0,0002	0,014 \pm 0,001
IL-18	0,037 \pm 0,003	0,050 \pm 0,006	0,031 \pm 0,002	0,043 \pm 0,003*
TNF-α	0,054 \pm 0,004	0,312 \pm 0,029*	0,041 \pm 0,005	0,059 \pm 0,003*
INF-γ	0,021 \pm 0,002	0,070 \pm 0,006*	0,023 \pm 0,002	0,069 \pm 0,006*

Tabela 1: Níveis aumentados de mediadores inflamatórios 24 horas após a indução experimental de meningite no córtex frontal e hipocampo. Os resultados são expressos como a média \pm SEM para n = 5-6 ratos. * P <0,05 em comparação com os controles.

Citocinas (pg/ μ g)	Córtex pré-frontal - 10 dias		Hipocampo - 10 dias	
	Controle	Meningite	Controle	Meningite
IL-1 α	0,1083 \pm 0,012	0,133 \pm 0,016	0,082 \pm 0,013	0,096 \pm 0,014
IL-1 β	0,347 \pm 0,029	0,316 \pm 0,026	0,212 \pm 0,015	0,175 \pm 0,009
IL-4	0,009 \pm 0,001	0,006 \pm 0,001	0,010 \pm 0,001	0,022 \pm 0,002*
IL-6	0,423 \pm 0,048	0,480 \pm 0,067	0,198 \pm 0,031	0,199 \pm 0,025
IL-10	0,084 \pm 0,006	0,110 \pm 0,016	0,029 \pm 0,004	0,031 \pm 0,004
IL-12	0,192 \pm 0,022	0,085 \pm 0,011*	0,08 \pm 0,013	0,086 \pm 0,009
IL-17	0,088 \pm 0,008	0,043 \pm 0,008*	0,040 \pm 0,006	0,019 \pm 0,003*
IL-18	0,043 \pm 0,004	0,039 \pm 0,004	0,077 \pm 0,0011	0,073 \pm 0,004
TNF- α	0,022 \pm 0,001	0,032 \pm 0,002*	0,019 \pm 0,002	0,010 \pm 0,001
INF- γ	0,093 \pm 0,007	0,101 \pm 0,006	0,082 \pm 0,008	0,074 \pm 0,004

Tabela 2: Níveis aumentados de mediadores inflamatórios 10 dias após a indução experimental de meningite no córtex frontal e hipocampo. Os resultados são expressos como a média \pm SEM para n = 5-6 ratos. * P <0,05 em comparação com os controles.

4.4 ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS GLIAIS

Para entender a contribuição das células glial após a meningite, foi avaliado a presença de marcadores microgliais (IBA-1, CD 11B), astrócitos (GFAP), oligodendrócitos (Oligo) e neuronais (NeuN) 24 horas e 10 dias após a indução experimental da meningite. No grupo meningite, foi observado expressão aumentada de GFAP (P <0,05), 24 horas após a infecção, sem alteração significativa nos níveis de IBA-1, Oligo e NeuN no córtex frontal (figura 10). No entanto, no hipocampo, foi encontrado um aumento significativo na expressão dos marcadores microgliais IBA-1 (P <0,05) e CD 11B (P <0,05) e GFAP (P < 0,05) no grupo meningite 24h após a infecção (figura 10).

Foi observado uma expressão aumentada de IBA-1 (P <0,05), CD 11B (P <0,05) e GFAP (P <0,05) no córtex frontal ou no hipocampo 10 dias após a infecção, sem alterações significativas nos níveis de Oligo ou NeuN (figura. 11). Também se observou uma expressão aumentada de C1q, o primeiro subcomponente do complexo C1 na via clássica de ativação do complemento, 10 dias após a indução da meningite (figura 11), mas nenhuma alteração foi observada 24 horas após a infecção (figura 10).

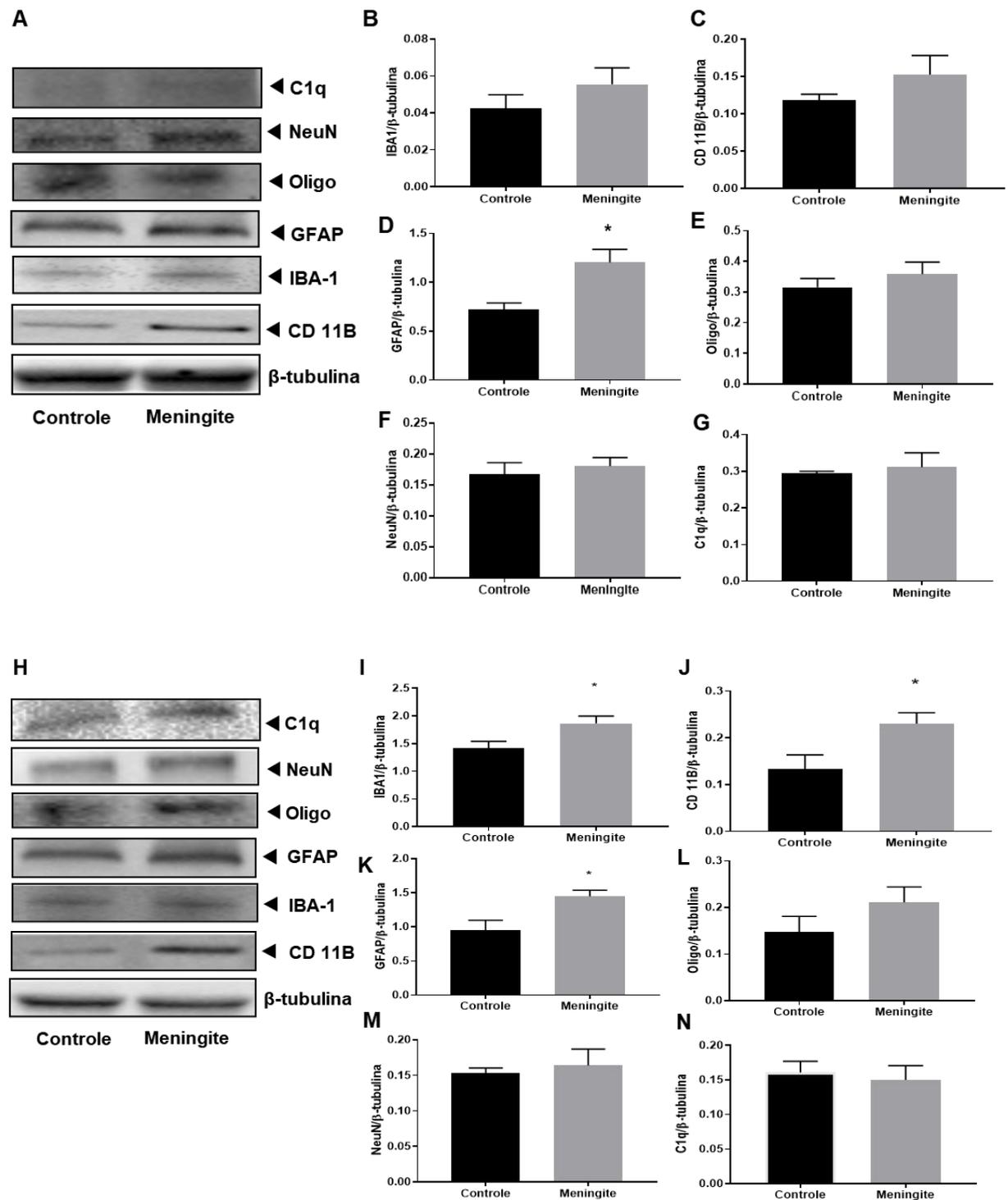


Figura 10: Regulação positiva de marcadores glias 24 horas após a indução experimental de meningite no córtex frontal e hipocampo. Análise de Western blot dos níveis de proteína do tecido de marcadores glias e neuronais. A quantificação dos dados do immunoblot por meio da análise densitométrica de cada proteína foi realizada no software Image Lab™ (Bio-Rad, CA, EUA). Immunoblots representativos (A) e quantificação de IBA-1 (B), CD 11B (C), GFAP (D), Oligo (E), NeuN (F), C1q e β-tubulina (G) no córtex frontal e representativos (H) e quantificação de IBA-1 (I), CD 11B (J), GFAP (K), Oligo (L), NeuN (M), C1q e β-tubulina (N) no hipocampo. Os valores de todos os níveis de proteína foram normalizados para os da β-tubulina. Os resultados são expressos como a média ± SEM para n = 4-5 ratos. * P < 0,05 em comparação com os controles.

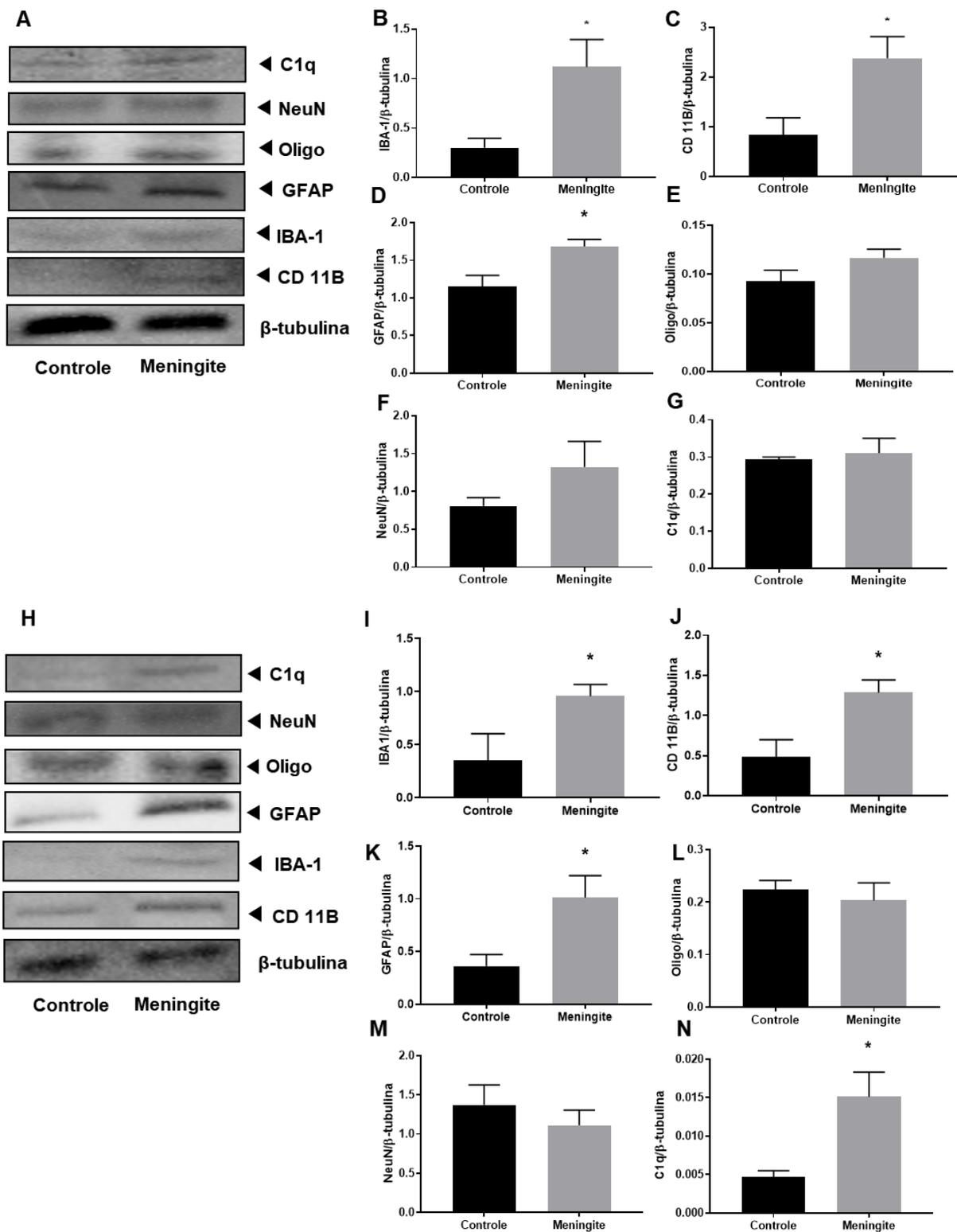


Figura 11: Regulação positiva de marcadores glias 10 dias após a indução experimental de meningite no córtex frontal e hipocampo. Análise de Western blot dos níveis de proteína do tecido de marcadores glias e neuronais. A quantificação dos dados do imunoblot por meio da análise densitométrica de cada proteína foi realizada no software Image Lab™ (Bio-Rad, CA, EUA). Imunoblots representativos (A) e quantificação de IBA-1 (B), CD 11B (C), GFAP (D), Oligo (E), NeuN (F), C1q e β-tubulina (G) no córtex frontal e representativos (H) e quantificação de IBA-1 (I), CD 11B (J), GFAP (K), Oligo (L), NeuN (M), C1q e β-tubulina (N) no hipocampo. Os valores de todos os níveis de proteína foram normalizados para os da β-tubulina. Os resultados são expressos como a média ± SEM para n = 4-5 ratos. * P < 0,05 em comparação com os controles.

Além disso, para confirmar a expressão e morfologia glial, foi realizado uma análise de IF. Os resultados de IF demonstraram um aumento significativo na expressão de núcleos positivos para IBA-1 ($P < 0,01$) no hipocampo 24 horas após a infecção com meningite (figura 13). A expressão de IBA-1 foi aumentada tanto no córtex frontal ($P < 0,01$) quanto no hipocampo ($P < 0,01$) no grupo com meningite de 10 dias (figura 15). Também se observou um aumento significativo na expressão de células GFAP-positivas no córtex frontal ($P < 0,01$) e hipocampo ($P < 0,01$) do grupo meningite 24 horas após a infecção, em comparação com os níveis no grupo controle (figura 17). Curiosamente, a ativação microglial foi persistente, podendo ser observada até 10 dias após a indução de meningite experimental. Da mesma forma, a expressão de GFAP também foi elevada em ambos, córtex frontal ($P < 0,01$) e hipocampo ($P < 0,05$) do grupo meningite de 10 dias em comparação com os níveis dos controles (figura. 19).

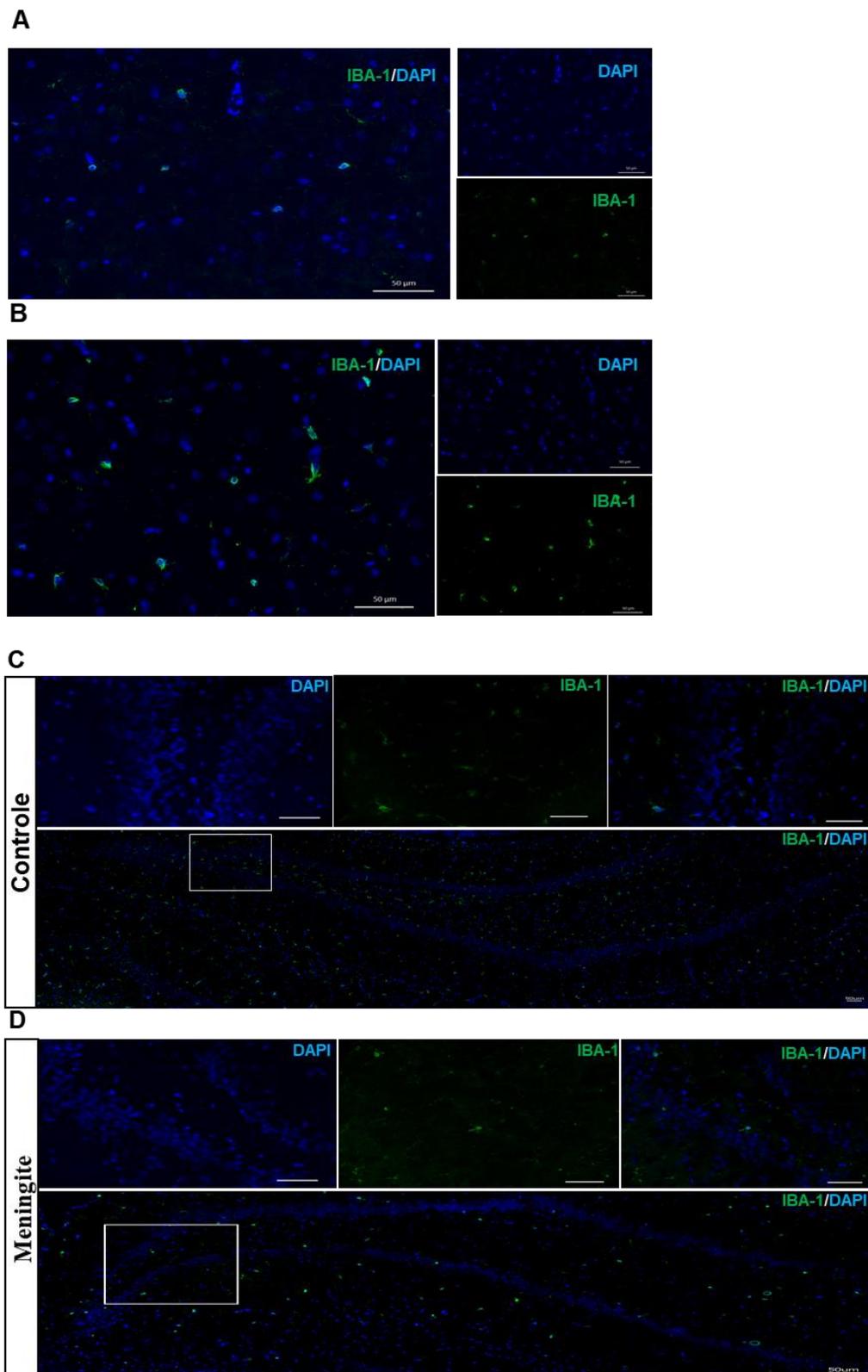


Figura 12: Aumento da ativação microglial 24 horas após a indução experimental da meningite. Análise de imunofluorescência para células positivas para IBA-1 em ratos experimentais com meningite e ratos controle. **A, B** Imagens de campo microscópicas representativas (ampliação, $\times 400$) imunocoradas com anticorpos IBA-1 no córtex frontal por 24h. **C, D** Imagens de campo microscópicas representativas (ampliação, $\times 200$) imunocoradas com anticorpos IBA-1 no hipocampo por 24h.

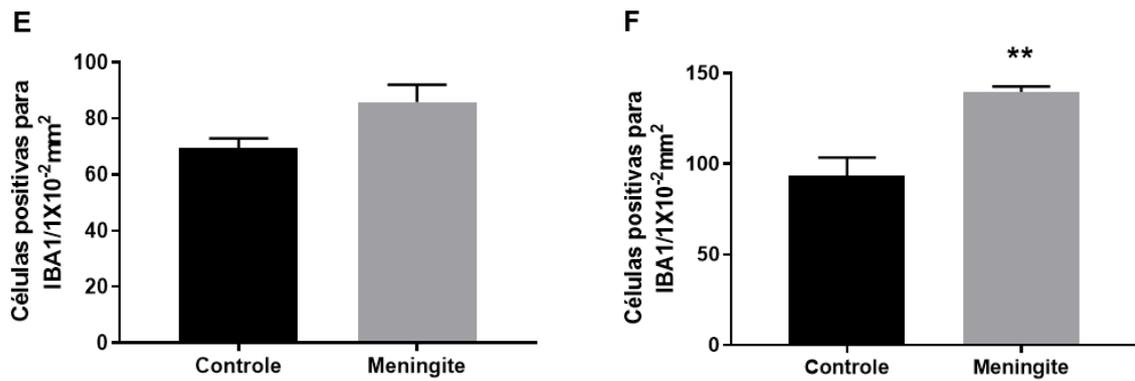


Figura 13: Aumento da ativação microglial 24 horas após a indução experimental da meningite. O número de células IBA-1-positivo / $1 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ na **E** córtex frontal e **F** hipocampo depois de 24h. Os resultados são expressos como a média \pm SEM para $n = 4-5$ ratos. ** $P < 0,01$ em comparação com os controles.

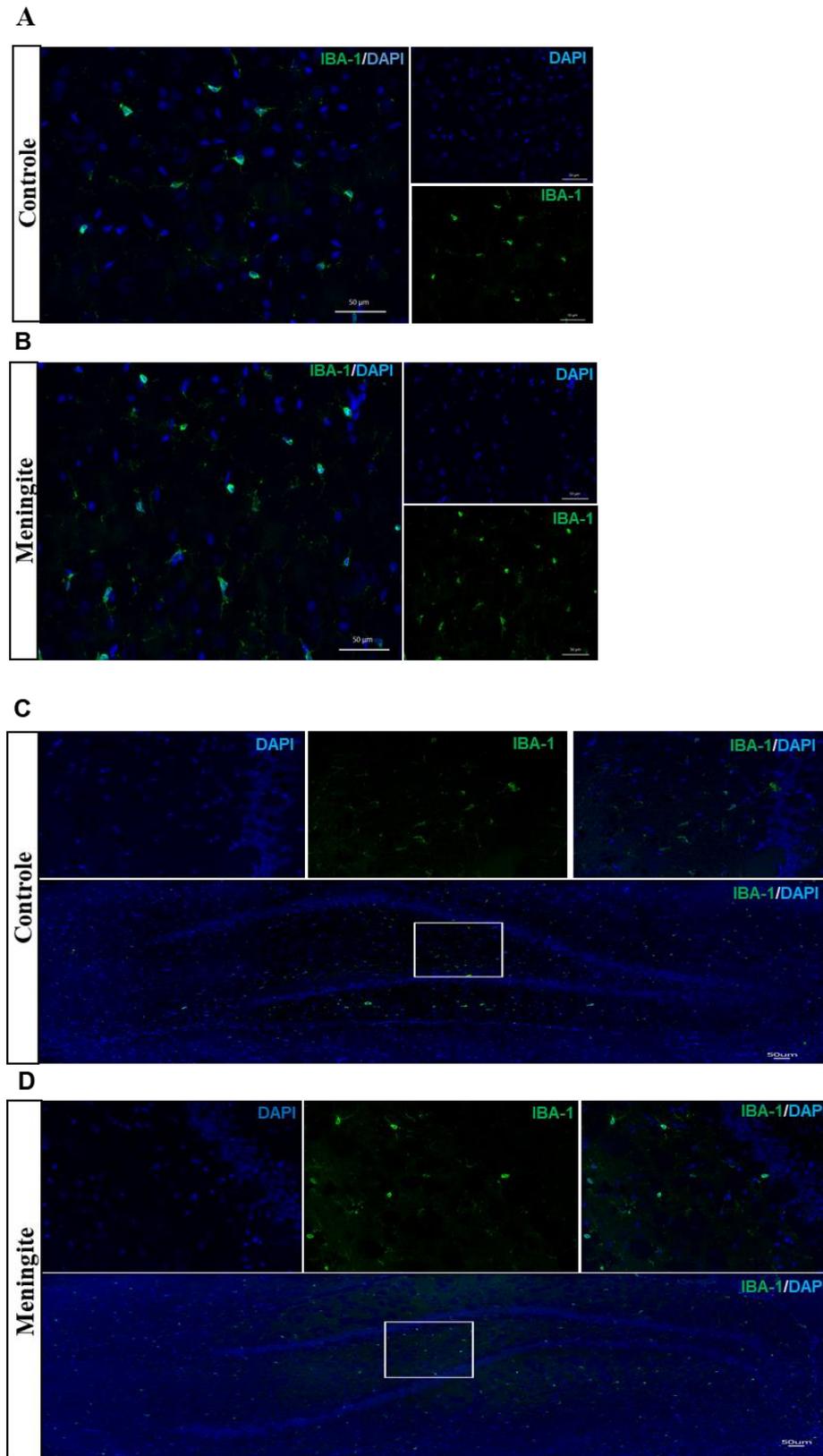


Figura 14: Aumento da ativação microglial 10 dias após a indução experimental da meningite. Análise de imunofluorescência para células positivas para IBA-1 em ratos experimentais com meningite e ratos controle. **A, B** Imagens de campo microscópicas representativas (ampliação, $\times 400$) imunocoradas com anticorpos IBA-1 no córtex frontal por 24h. **C, D** Imagens de campo microscópicas representativas (ampliação, $\times 200$) imunocoradas com anticorpos IBA-1 no hipocampo por 24h.

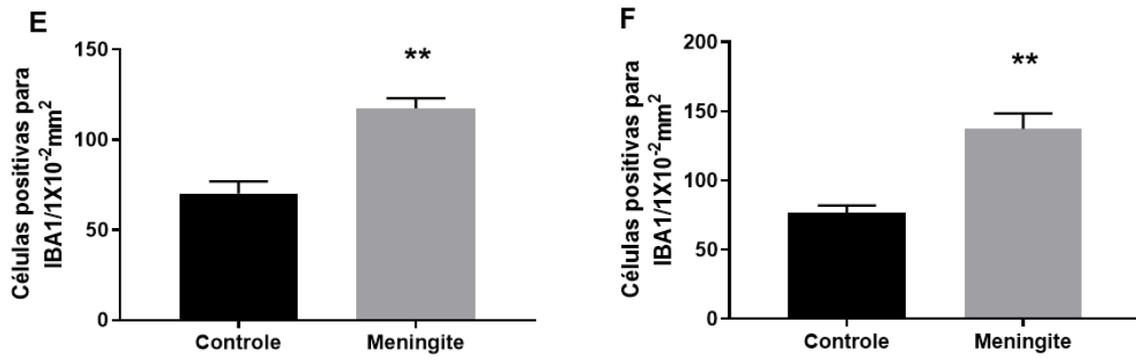


Figura 15: Aumento da ativação microglial 10 dias após a indução experimental da meningite. O número de células IBA-1-positivo/ $1 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ na **E** córtex frontal e **F** hipocampo depois de 24 h. Os resultados são expressos como a média \pm SEM para $n = 4-5$ ratos. ** $P < 0,01$ em comparação com os controles.

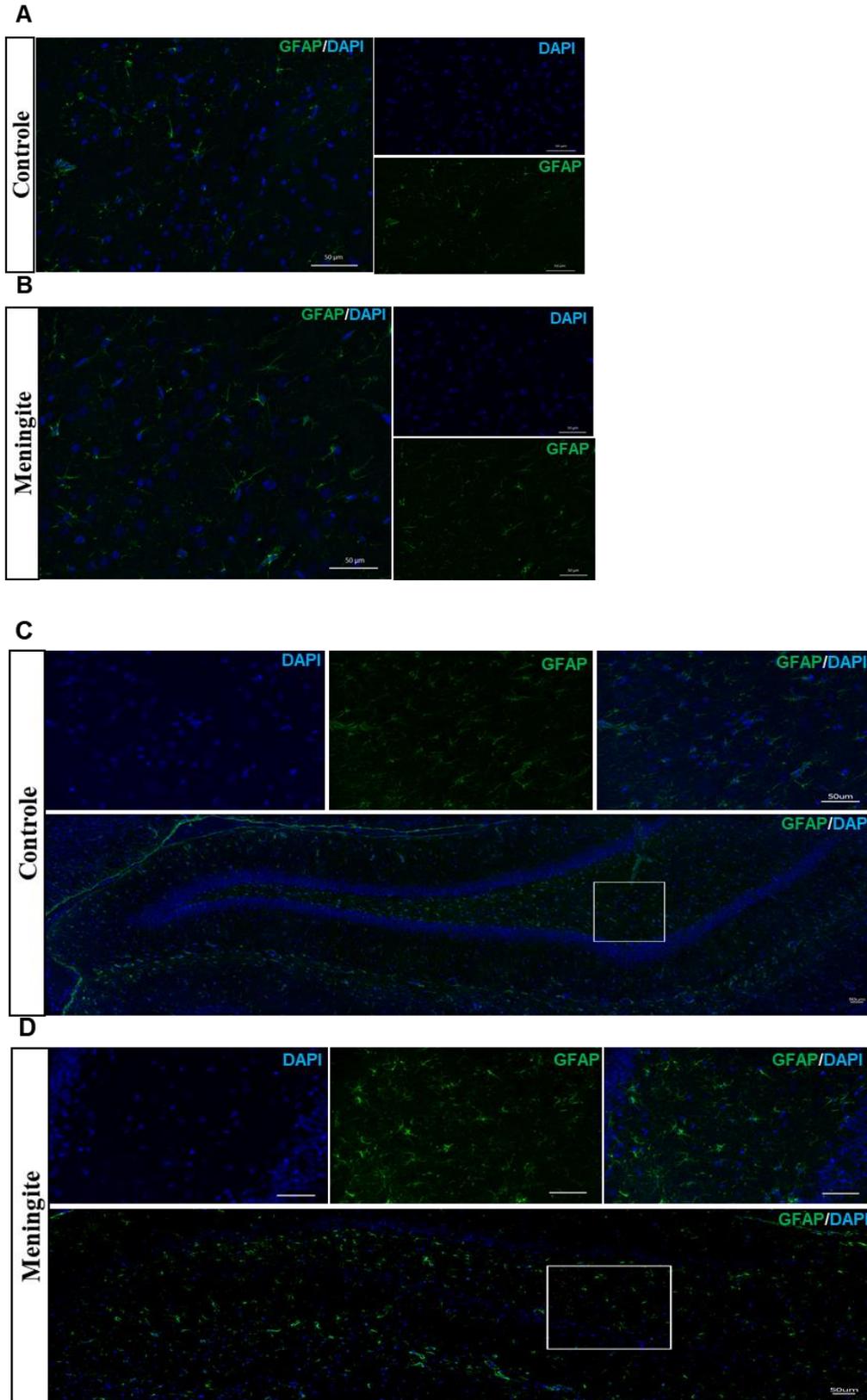


Figura 16: Aumento da ativação astrogliar 24 horas após a indução experimental da meningite. Análise de imunofluorescência para células GFAP-positivas em ratos experimentais com meningite e ratos controle. **A, B** Imagens de campo microscópicas representativas (ampliação, $\times 400$) imunocoradas com anticorpos GFAP no córtex frontal por 24h. **C, D** Imagens de campo microscópicas representativas (ampliação, $\times 200$) imunocoradas com anticorpos GFAP no hipocampo por 24 h.

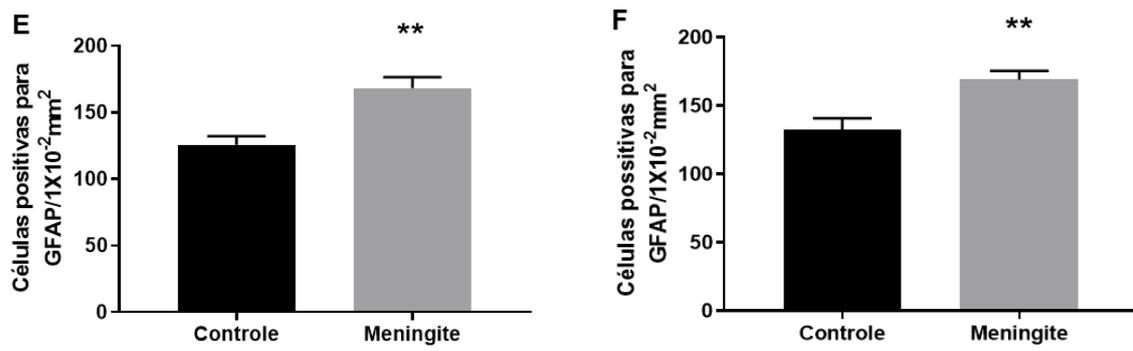


Figura 17: Aumento da ativação astrogliar 24 horas após a indução experimental da meningite. O número de células GFAP-positivas / $1 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ no **E** córtex frontal e **F** hipocampo após 24 h. Os resultados são expressos como a média \pm SEM para $n = 4-5$ ratos. ** $P < 0,01$ em comparação com os controles.

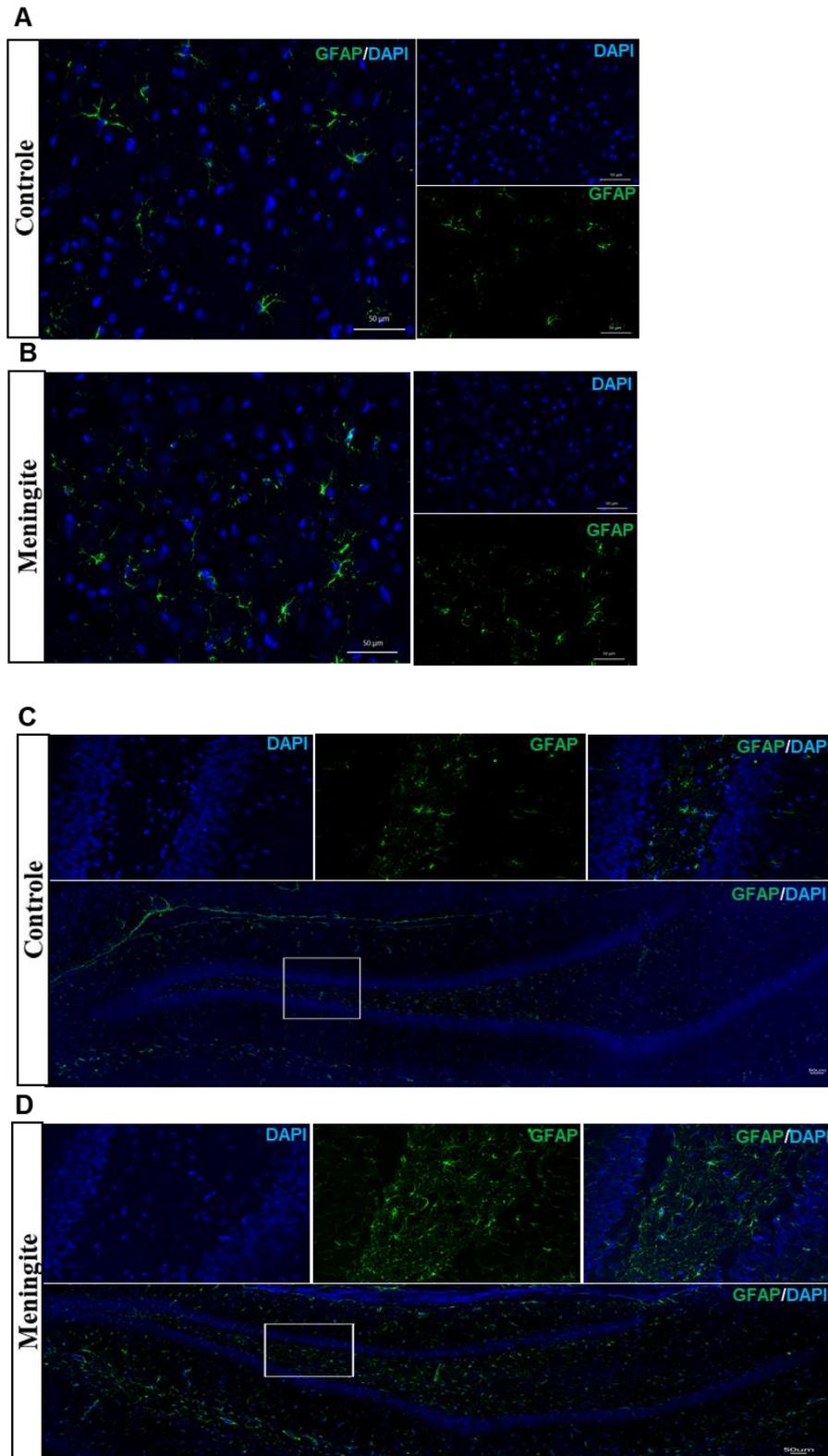


Figura 18: Aumento da ativação astrogliar 10 dias após a indução experimental da meningite. Análise de imunofluorescência para células GFAP-positivas em ratos experimentais com meningite e ratos controle. **A, B** Imagens de campo microscópicas representativas (ampliação, $\times 400$) do grupo de 10 dias imunomarcado com anticorpos GFAP no córtex frontal. **C, D** Imagens de campo microscópicas representativas (ampliação, $\times 200$) do grupo de 10 dias imunomarcado com GFAP no hipocampo.

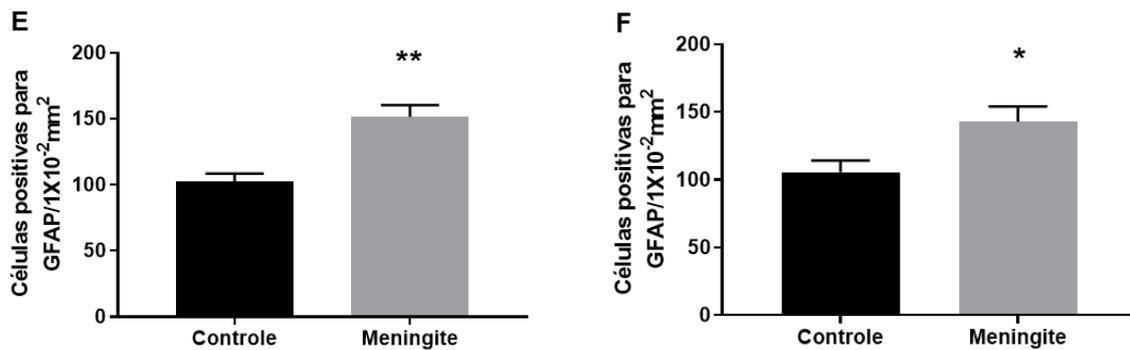


Figura 19: Aumento da ativação astrogliar 10 dias após a indução experimental da meningite. O número de células positivas para GFAP / $1 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ na **E** córtex frontal e **F** hipocampo no grupo dos 10 dias. Os resultados são expressos como a média \pm SEM para $n = 4-5$ ratos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ em comparação com os controles.

4.5 REGULAÇÃO POSITIVA DA EXPRESSÃO DE TSPO E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL APÓS MENINGITE EXPERIMENTAL

Para entender a via mitocondrial mediada por TSPO, foi avaliado a expressão das proteínas TSPO e VDAC da membrana externa das mitocôndrias e da proteína mitocondrial interna ANT. Além disso, a expressão de citocromo-c, cardiolipina, caspase-3 e caspase-9 foram avaliados nos grupos de 24h e 10 dias.

Não houve mudança significativa na expressão de TSPO, VDAC e ANT 24 horas após a indução da meningite, entre os grupos controle e meningite (figura 20). Foi observado níveis elevados de TSPO e expressão de citocromo-c ($P < 0,05$) no hipocampo do grupo com meningite, 24h após a indução da meningite, sem alteração na expressão de VDAC e ANT. Curiosamente, os níveis de expressão de TSPO no grupo com meningite aumentaram 10 dias após a infecção tanto no córtex frontal ($P < 0,05$) quanto no hipocampo ($P < 0,01$) (figura 21). Esses resultados são consistentes com a expressão de TSPO e gliose reativa após lesão do SNC, em que as células gliais regulam positivamente o TSPO (Mcneela et al., 2018). Neste estudo, a expressão de TSPO foi acompanhada pela supra regulação simultânea dos níveis de citocromo-c ($P < 0,05$) no grupo de 10 dias, sem alteração significativa nos níveis de VDAC e ANT.

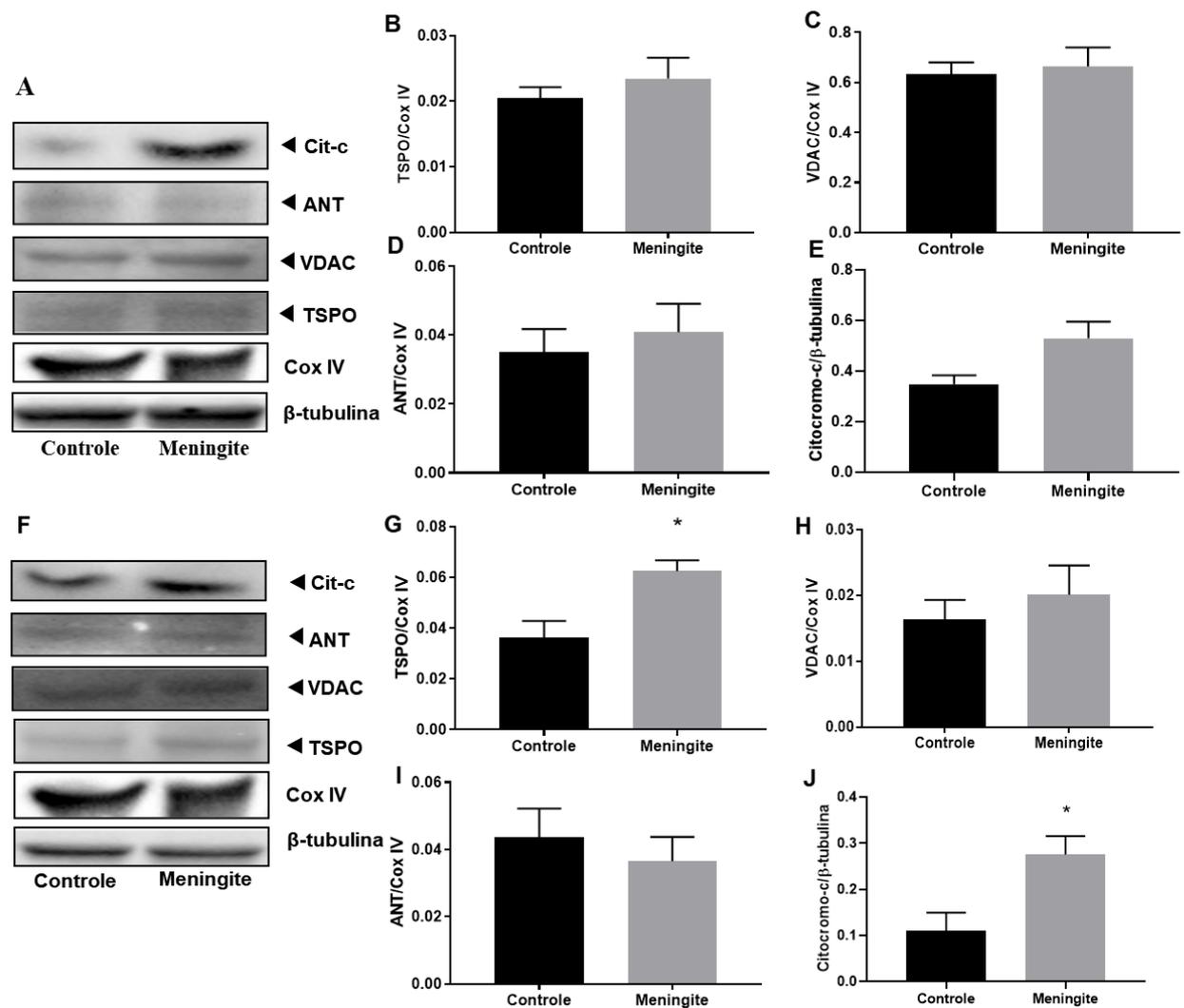


Figura 20: Regulação positiva da expressão do alvo neuroimunomodulador TSPO 24 h após a indução experimental de meningite no córtex frontal e hipocampo. Análise de Western blot dos níveis de proteína do tecido das proteínas mitocondriais. A quantificação dos dados do imunoblot por meio da análise densitométrica de cada proteína foi realizada no software Image Lab™ (Bio-Rad, CA, EUA). Imunoblots representativos (A) e a quantificação de TSPO (B), VDAC (C), ANT (D), citocromo-c (E) e controles de carga, COX IV e β -tubulina em córtex frontal e representativos (F) e a quantificação de TSPO (G), VDAC (H), ANT (I), citocromo-c (J) no hipocampo. Os valores de todos os níveis de proteína foram normalizados para os níveis de COX IV ou β -tubulina. Os resultados são expressos como a média \pm SEM para n = 4-5 ratos. *P < 0,05 em comparação com os controles.

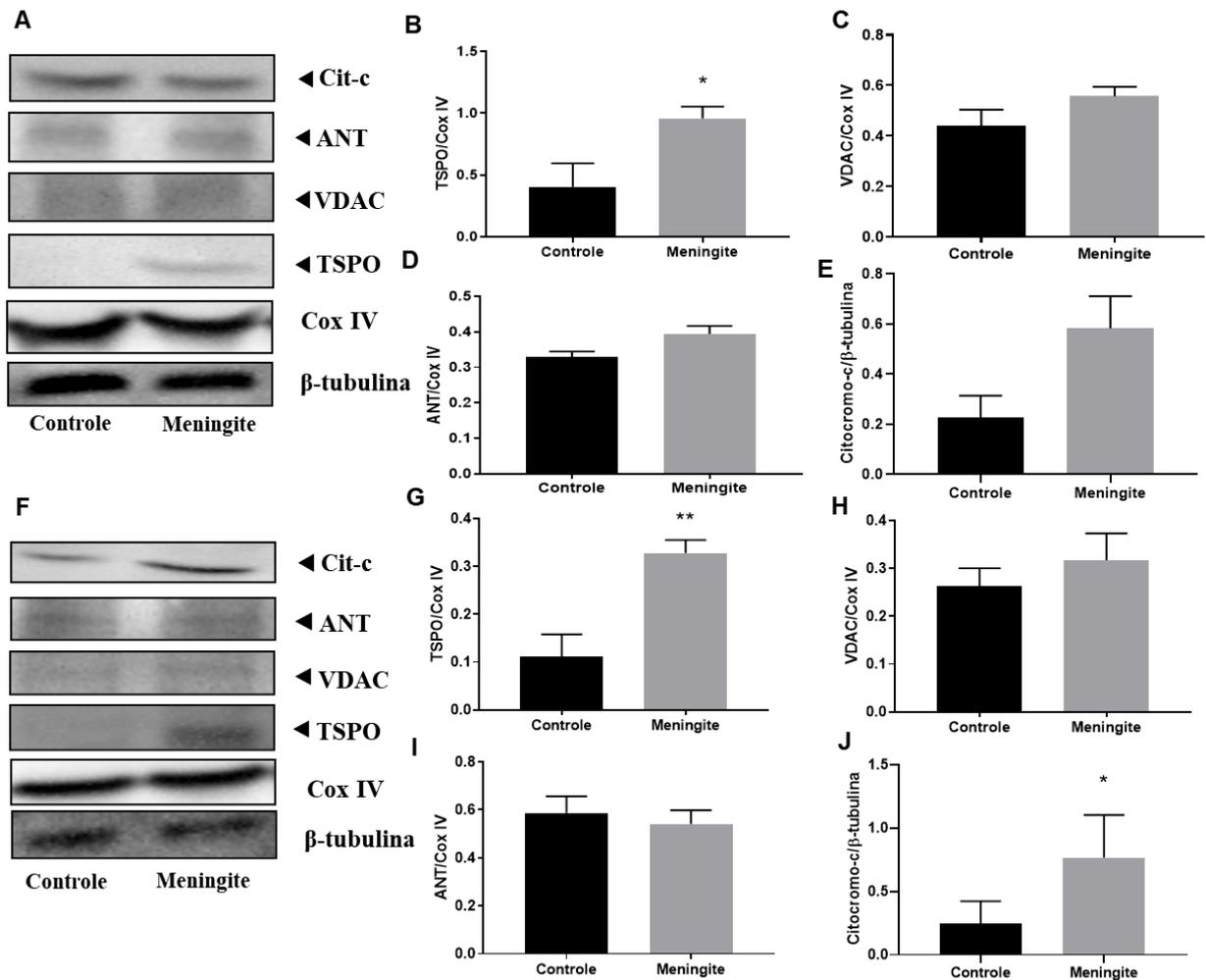


Figura 21: Aumento da expressão do alvo neuroimunomodulador TSPO 10 dias após a indução experimental de meningite no córtex frontal e hipocampo. Análise de *Western blot* dos níveis de proteína do tecido da proteína mitocondrial. A quantificação dos dados do immunoblot por meio da análise densitométrica de cada proteína foi realizada no software Image Lab™ (Bio-Rad, CA, EUA). Immunoblots representativos (A) e a quantificação de TSPO (B), VDAC (C), ANT (D), citocromo-c (E) e controles de carga, COX IV e β -tubulina em córtex frontal e representativos (F) e a quantificação de TSPO (G), VDAC (H), ANT (I), citocromo-c (J) no hipocampo. Os valores de todos os níveis de proteína foram normalizados para os níveis de COX IV ou β -tubulina. Os resultados são expressos como a média \pm SEM para $n = 4-5$ ratos. * $P < 0,05$ em comparação com os controles.

Como houve um aumento nos níveis de citocromo-c, também foram analisados os níveis de cardiolipina por meio de ELISA. Observou-se diminuição dos níveis de cardiolipina hipocampal ($P < 0,05$) 10 dias após a infecção por meningite (figura 22). Para finalizar a avaliação da via mitocondrial, foi analisado os níveis de caspase-3 e caspase-9. Dez dias após a indução da meningite, os níveis de ambos os marcadores celulares, caspase-3 e caspase-9, aumentaram ($P < 0,05$) no hipocampo, sem alterações significativas no grupo de 24 h, exceto caspase-3, que aumentou significativamente ($P < 0,05$) no hipocampo do grupo meningite (figura 22).

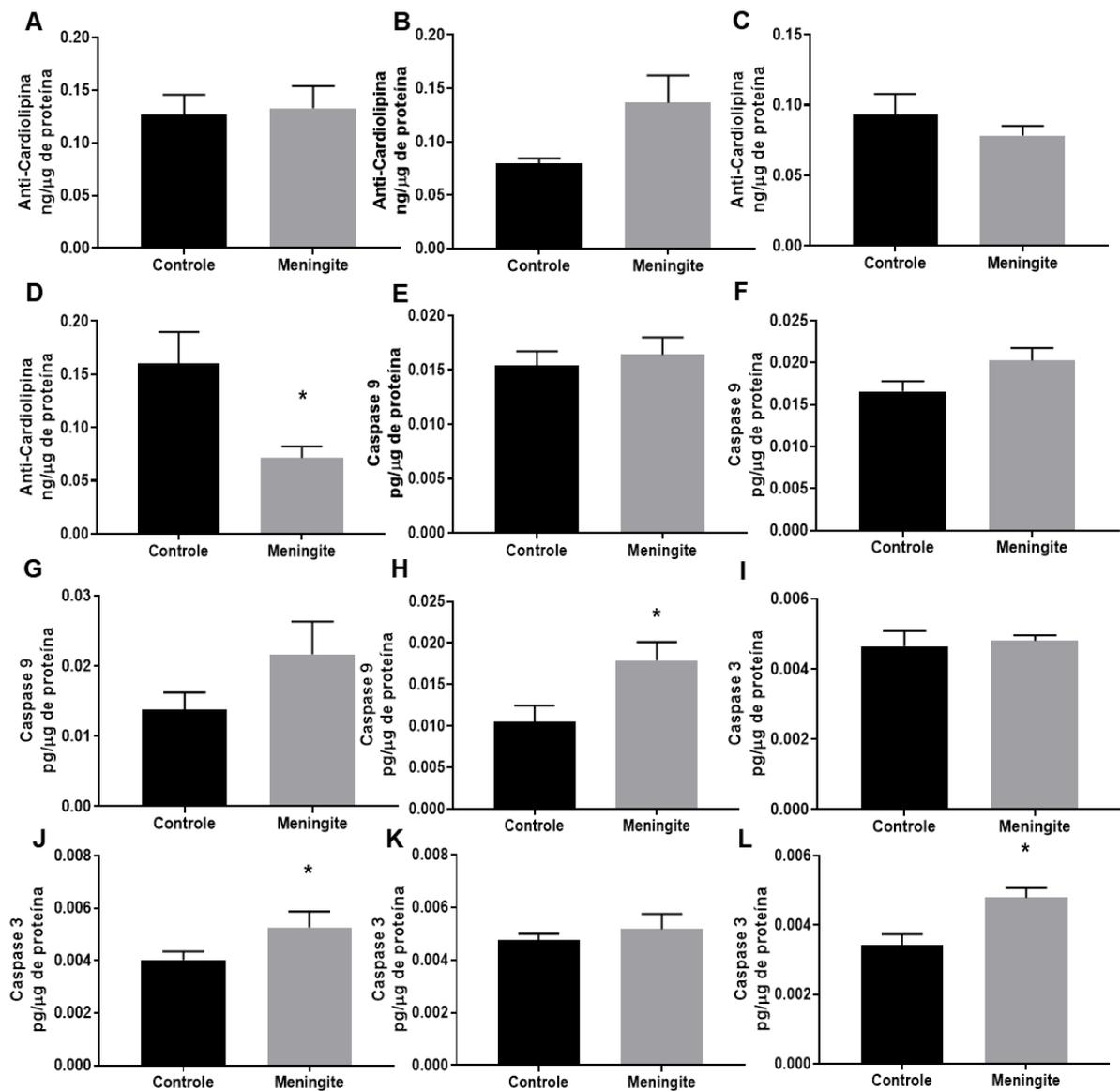


Figura 22: Níveis diminuídos de cardiolipina e níveis elevados de caspase após meningite experimental. Análise por ELISA para os níveis de proteína do tecido de cardiolipina em ratos de controle e de meningite experimental em **A** córtex frontal e **B** hipocampo 24 h após a indução da meningite em **C** córtex frontal e **D** hipocampo 10 dias após a indução. Análise ELISA para níveis de proteína tecidual de caspase-3 em ratos experimentais com meningite e ratos controle em **E** córtex frontal e **F** hipocampo 24 h após a indução da meningite em **G** córtex frontal e **H** hipocampo 10 dias após a indução. Os resultados são expressos como a média \pm SEM para $n = 5$ ratos. * $P < 0,05$ em comparação com os controles.

4.6 DECLÍNIO COGNITIVO AVALIADO EM RATOS SOBREVIVENTES DE MENINGITE

Teste de habituação ao campo aberto

O teste de campo aberto é usado para avaliar a memória de habituação em roedores (Vianna et al., 2000). No grupo controle, foi encontrada diferença significativa entre as sessões de treinamento e teste, medidas pelo número de cruzamentos das linhas e apoio nas patas traseiras ($P < 0,05$). No entanto, o prejuízo na memória de habituação foi mostrado em ratos com meningite, pois eles não mostraram diferença no comportamento entre as sessões de treinamento e teste (figura 23 A).

Teste de esquiva inibitória

A memória aversiva em roedores é avaliada pelo teste de esquiva inibitória (Borba Filho et al., 2015). Não foi encontrada diferença na latência, medida em segundos, entre as sessões de treinamento e teste nos ratos experimentais com meningite, demonstrando um declínio na memória aversiva. Por outro lado, nos ratos controle, houve um aumento significativo no tempo de latência, demonstrando retenção de memória aversiva ($P < 0,05$; figura 23 B).

Teste de reconhecimento de objetos novos

A tarefa de reconhecimento de objetos novos testa o reconhecimento de objetos familiares e objetos novos e envolve lembrança e familiaridade. A recuperação bem-sucedida dos detalhes contextuais que acompanham o episódio de aprendizagem denota lembrança. A familiaridade envolve a identificação do item apresentado anteriormente (Squire et al., 2007). Foi observado que os ratos submetidos à meningite experimental passaram menos tempo com o novo objeto. O grupo com meningite mostrou um índice de reconhecimento significativamente reduzido ($P < 0,05$) em comparação com o grupo controle. No entanto, não houve diferenças significativas na atividade locomotora entre os dois grupos (figura 23 C – E).

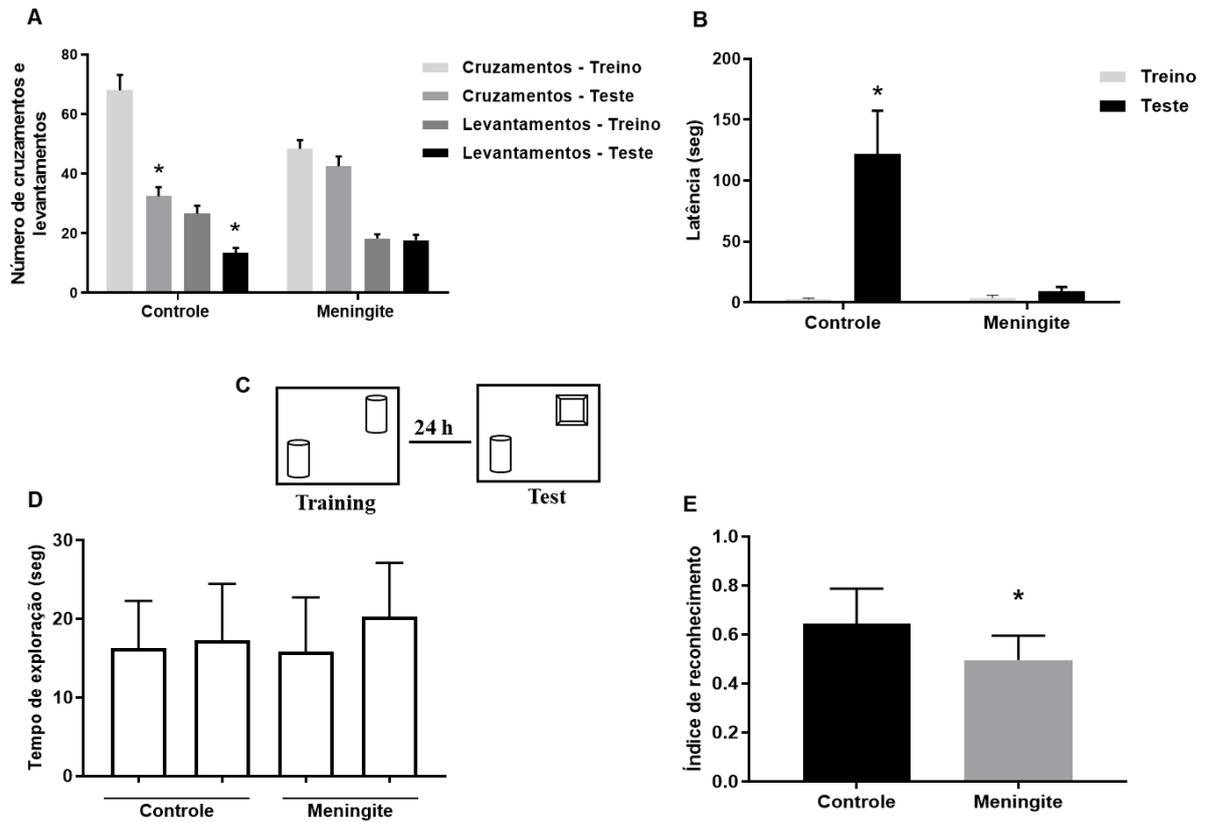


Figura 23: **A** - Teste de campo aberto. **B** - Tarefa de esquia inibitória. **C** - Representação esquemática do teste de reconhecimento de objetos novos. **D** - Atividade locomotora. **E** - Índice de reconhecimento. Os resultados são expressos como a média \pm SEM para $n = 10$ ratos. * $P < 0,05$ em comparação com os controles.

5 DISCUSSÃO

A principal resposta imune do SNC, a inflamação, é mediada por células não neuronais, que incluem a microglia e os astrócitos. Uma característica marcante das microglias é sua rápida ativação até mesmo em resposta a pequenas alterações patológicas no SNC. A microglia ativada pode fagocitar e liberar mediadores inflamatórios para eliminar microrganismos invasores, remover detritos potencialmente deletérios, promover o reparo do tecido pela secreção de fatores de crescimento e, assim, facilitar o retorno à homeostase do tecido. Embora a resposta neuroinflamatória inicial seja essencial para regular a homeostase cerebral, a inflamação crônica ou mal regulada pode levar a efeitos prejudiciais (Li e Barres, 2018). A densidade de microglias variam entre as regiões cerebrais, predominando na substância cinza com altas concentrações no hipocampo e córtex frontal (Mittelbronn et al., 2001). Em consonância com este fato, foi testado a resposta inflamatória induzida por meningite experimental em condições aguda (24 h) e de longo prazo (10 dias).

Vinte e quatro horas após a indução da meningite, foi observado um aumento da ativação microglial e astrogliar *in vivo* nos grupos meningite por imagem TSPO-PET. As trajetórias da inflamação foram ainda evidenciadas por aumentos nos níveis de citocinas inflamatórias, marcadores de estresse oxidativo e marcadores de ativação glial no grupo de 24 horas. Somente o uso da PET como ferramenta não foi possível diferenciar entre microglia e astrócitos. No entanto com o auxílio da imunohistoquímica foi possível verificar um aumento da expressão de microglia nas estruturas avaliadas.

Como afirmado acima, o aumento inicial da resposta inflamatória após a indução da meningite é fundamental para eliminar o patógeno e regular o equilíbrio do cérebro. No entanto, foi intrigante notar que embora os ratos nos grupos meningite em 10 dias estivessem livres de infecção, um aumento na inflamação foi evidenciado por um SUV maior de ^{11}C -PBR28 em seus cérebros. As alterações subcelulares que ocorrem nos níveis do marcador inflamatório TSPO após a ativação da microglia não são conhecidas.

Após a administração intravenosa de LPS em humanos, a microglia se mostrou ativada, mudando de uma morfologia ramificada para uma morfologia amebóide. Após a ativação, a microglia expressa a TSPO, que pode ser visualizado

com o radiotraçador ^{11}C -PBR28 no cérebro humano vivo. (Kreutzberg, 1996). A transição para uma morfologia amebóide pode resultar em um aumento na população mitocondrial sem uma mudança na quantidade de TSPO por mitocôndria. Ou um aumento na quantidade de TSPO por mitocôndria sem alterações no número de mitocôndrias pode ser uma outra possibilidade. Embora não seja confirmado experimentalmente, o número de mitocôndrias, bem como a quantidade de TSPO por mitocôndria, provavelmente aumentam com a ativação microglial, e essas alterações podem ter efeitos prejudiciais nas células (Venneti et al., 2006).

Consistente com trabalhos anteriores em modelo animal de meningite pneumocócica, os ratos do grupo com meningite de 10 dias demonstraram comprometimento cognitivo significativo na bateria de testes comportamentais (Barichello, Goncalves, et al., 2013; Barichello et al., 2014). Os ratos são instintivamente, como muitos mamíferos, animais curiosos. Porém, durante o teste, os ratos que tiveram meningite gastaram menos tempo explorando os objetos novos, demonstrando perda de memória de reconhecimento, conforme observado no teste reconhecimento de objetos novos. Um estudo que relacionou os efeitos de uma lesão do hipocampo com o teste de reconhecimento de objetos novos sustentaram que o hipocampo participa da codificação e consolidação da memória do objeto (Cohen e Stackman, 2015).

Na tarefa de esquivar inibitória, não foi encontrada diferença no tempo de latência, que é a permanência na plataforma, entre o teste e as sessões de treinamento, demonstrando um declínio cognitivo em ratos com meningite, diferente do controle que demoram para descer da plataforma. Além disso, o comprometimento da memória de habituação foi evidenciado pela tarefa de campo aberto, no grupo com meningite. O hipocampo é uma região cerebral muito vulnerável além de ser uma região crítica para a consolidação da memória (Semmler et al., 2005; Semmler et al., 2013).

Assim, este estudo levanta a hipótese que a ativação microglial persistente seguida por neuroinflamação evidenciada por uma exacerbada expressão de TSPO pode desempenhar um papel importante no declínio cognitivo de longo prazo exibido em animais com meningite. A TSPO é uma proteína desenvolvida evolutivamente e sua função primária é transportar o colesterol para a membrana mitocondrial interna para a produção de esteróides. A TSPO também desempenha um papel na regulação

de muitos processos celulares, incluindo respostas inflamatórias, estresse oxidativo e homeostase mitocondrial (Sandiego et al., 2015; Bonsack e Sukumari-Ramesh, 2018).

Um estudo sugere que o TSPO é expresso temporariamente em células que enfrentam condições de estresse oxidativo, incluindo inflamação e lesão tecidual. Ele pode estar envolvido em mecanismos complexos de sinalização de homeostase. Portanto, o principal papel fisiológico das TSPOs pode ser modular o estresse oxidativo, independentemente do tipo de célula (Batoko et al., 2015). Neste contexto, é importante para este trabalho, avaliar os parâmetros de estresse oxidativo após a meningite. Foi encontrado marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo em níveis elevados, como MDA, proteína carbonila e níveis de nitrito/nitrato, no córtex frontal de ratos com meningite em comparação com os controles. Uma diminuição na defesa enzimática, como as atividades da SOD e CAT, foi observada tanto no córtex frontal quanto no hipocampo dos ratos com meningite.

Em consonância com os resultados apresentados neste trabalho, um estudo clínico em crianças com meningite séptica, mostrou níveis de MDA, proteína carbonil e nitrito no plasma e líquido cefalorraquidiano aumentados significativamente. Em contrapartida, neste mesmo estudo, os níveis de ácido ascórbico, glutatona e SOD no plasma e líquido cefalorraquidiano diminuíram significativamente em crianças com meningite séptica (Srivastava et al., 2013). Níveis significativamente elevados de MDA, nitrito e proteína carbonil refletem aumento do estresse oxidativo, enquanto atividades diminuídas da SOD e CAT indicam uma atividade antioxidantes na meningite. Assim, as mudanças nos oxidantes e antioxidantes observadas sugerem a produção de ERO e seu possível papel na patogênese da meningite bacteriana (De Menezes et al., 2009).

A microglia e os astrócitos ativados no SNC são as fontes primárias de citocinas durante uma resposta inflamatória reativa, embora neurônios e células endoteliais possam servir como outras fontes em condições específicas, dentro de certas cascatas de sinalização (Curfs et al., 1997; Coughlin et al., 2016). Os resultados deste estudo demonstram uma grande quantidade de citocinas inflamatórias, como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α e INF- γ , no grupo com meningite em 24 horas. A ativação persistente da microglia leva ao aumento dos níveis de proteínas inflamatórias TNF- α e IL-4, 10 dias após a indução da meningite.

Corroborando com estes resultados, um estudo que avaliou a produção cerebral de citocinas durante a meningite pneumocócica grave acompanhada de

sepsis e identificou níveis elevados de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Møller et al., 2005). Um outro estudo, em animais com neurodegeneração progressiva existente, relatou que níveis elevados de TNF- α têm efeitos agudos robustos na função cerebral, incluindo depressão e disfunção cognitiva (Hennessy et al., 2017). Curiosamente, outras evidências experimentais sugerem que níveis elevados de IL-4 demonstraram neuroinflamação hipocampal e declínio cognitivo em um modelo de camundongo. A IL-4 também desempenha um papel negativo no desenvolvimento e cognição do cérebro em modelo de camundongo induzido pela vacinação contra hepatite B (Wang et al., 2018). Outro estudo, que avaliou mediadores pró-inflamatórios e a ativação de células microgлияis em amostras de cérebro de pacientes com esquizofrenia *post-mortem*, também identificou a presença elevada de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Como consequência, a neuroinflamação pode afetar os processos essenciais para a maturação normal do cérebro, como mielinização, poda sináptica e remodelação neuronal (Barichello et al., 2020). Outro estudo, analisou o LCR e soro de 75 indivíduos, com diferentes patologias, como esclerose múltipla, neuro-sífilis, neuro-borreliose de Lyme, meningite bacteriana e viral e pacientes com doenças neurológicas não inflamatórias e foi observado níveis aumentados de múltiplas citocinas em pacientes com doenças neuroinflamatórias quando comparados aos pacientes com doenças neurológicas não inflamatórias (Lepennetier et al., 2019).

Além da avaliação da ativação microglial *in vivo*, também foi confirmado por marcadores proteicos das células gliais no córtex frontal e no hipocampo por meio de técnicas convencionais. Foi identificada uma expressão aumentada de marcadores microgлияis IBA-1 e CD11B no hipocampo de rato com meningite 10 dias após a indução da meningite. A microglia, sendo as células imunes residentes do SNC, desempenha um papel importante na manutenção da homeostase do tecido e contribui para o desenvolvimento do cérebro em condições normais. No entanto, quando há uma lesão neuronal ou outro insulto, dependendo do tipo e magnitude dos estímulos, a microglia será ativada para secretar fatores pró-inflamatórios que aumentam a citotoxicidade ou fatores neuroprotetores antiinflamatórios que auxiliam na cicatrização de feridas e reparo de tecidos. A ativação excessiva da microglia danifica o tecido neural saudável circundante, e os fatores secretados pelos neurônios mortos ou moribundos, por sua vez, exacerbam a ativação crônica da microglia, causando perda progressiva de neurônios. É o caso observado em muitas doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, Doença de

Huntington e esclerose lateral amiotrófica (Subhramanyam et al., 2019). Corrigir os desequilíbrios da ativação crônica microglial, pode ser um modo potencial de intervenção terapêutica em doenças neurodegenerativas (Azam et al., 2021). A forte associação entre a superexpressão de proteínas gliais e prejuízo cognitivo também foi relatada em um modelo animal de intoxicação aguda com o diisopropilfluorofosfato e com lesão cerebral traumática (Flannery et al., 2016; Skovira et al., 2016).

Os astrócitos são as células gliais mais comuns no cérebro (Colombo e Farina, 2016). Assim como a microglia, os astrócitos também são reguladores das respostas inflamatórias no SNC. A ativação da microglia e dos astrócitos é heterogênea e tradicionalmente categorizada como neurotóxica (microglia do fenótipo M1 e astrócitos do fenótipo A1) ou neuroprotetora (microglia do fenótipo M2 e astrócitos do fenótipo A2) (Kwon e Koh, 2020). Como a superexpressão de TSPO também foi detectada em astrócitos reativos (Lavisse et al., 2012), se encontrou a expressão da proteína GFAP, aumentada nos grupos meningite 24h e 10 dias. Um relatório de Clarke et al. (2018) revelou que microglia pró-inflamatória secreta IL-1 α , TNF e C1q, e essas citocinas são suficientes para ativar astrócitos, denominados astrócitos A1 reativos (Clarke et al., 2018). Além disso, foi afirmado que os astrócitos A1 reativos falham em desempenhar funções normais e produzem componentes do complemento que liberam fatores tóxicos que, por sua vez, danificam os neurônios e oligodendrócitos, contribuindo assim para o declínio cognitivo em regiões cerebrais vulneráveis no envelhecimento normal (Clarke et al., 2018). Curiosamente, foi encontrado níveis elevados de TNF e C1q na região do hipocampo após 10 dias de indução da meningite, sugerindo a possibilidade de indução de astrócitos A1 reativos após meningite experimental.

Embora o trabalho não tenha encontrado nenhuma diferença na expressão de oligodendrócitos e proteínas neuronais, o declínio cognitivo reconhecido em sobreviventes de meningite pode ser parcialmente explicado pela ativação persistente de microglia e astrócitos após meningite experimental (Araki et al., 2021).

Evidências recentes apoiam fortemente o uso de TSPO como um alvo neuroimunomodulador para detectar neuroinflamação em distúrbios neurológicos e psiquiátricos (Rupprecht et al., 2010). No entanto, o papel do TSPO nas alterações inflamatórias induzidas por infecção ainda não foi explorado. Neste estudo, foi identificado uma expressão aumentada de TSPO *in vivo*, bem como no córtex frontal e no hipocampo de ratos sobreviventes à meningite. No entanto, não foi encontrado

diferenças nos níveis de outras proteínas mitocondriais, como, VDAC e ANT, mas documentou-se o aumento da expressão do citocromo-c no hipocampo de ratos com meningite em 10 dias.

O citocromo-c é conhecido principalmente por sua função na transferência de elétrons mitocondrial, o que o torna um participante chave na função de suporte vital da síntese de ATP. No entanto, uma série de outras funções foi identificada para os citocromos do tipo c. Quando uma célula recebe um estímulo apoptótico, o citocromo-c é liberado no citosol e dispara a morte celular programada por apoptose (Cai et al., 1998; Ow et al., 2008). Para o programa apoptótico intrínseco, é necessário a redistribuição de cardiolipina da membrana mitocondrial interna para a membrana mitocondrial externa e o subsequente acúmulo de produtos de oxidação da cardiolipina, catalisados pelo citocromo-c (Ji et al., 2012). A oxidação e degradação da cardiolipina por diferentes fatores sob estresse celular severo servem como um gatilho para programas de morte celular. Nesse contexto, a interação entre a cardiolipina e o citocromo-c é um processo chave nos estágios iniciais da apoptose (Díaz-Quintana et al., 2020). A cardiolipina oxidada causa a liberação de fatores pró-apoptóticos, incluindo citocromo-c, da mitocôndria para o citosol, que desencadeia a formação do apoptossomo Apaf-1 (Ji et al., 2012). A perda do conteúdo de cardiolipina também contribui para o fenótipo relacionado à idade geralmente associado à disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (Paradies et al., 1997).

O trabalho evidenciou um aumento significativo no citocromo-c 10 dias após a indução da meningite, com redução simultânea dos níveis de cardiolipina. Os níveis aumentados de citocromo-c ativaram a via da caspase, estimulando os níveis da caspase-3 e da caspase-9, que foram detectados por ELISA. Os resultados deste estudo são consistentes com relatórios anteriores de Bifrare et al. (2003) que confirmou a presença de apoptose documentando coloração positiva para caspase-3 específica para apoptose ativada em um modelo experimental de meningite (Bifrare et al., 2003). Além disso, um estudo indicou que o citocromo-c também pode ser liberado no espaço extracelular por células saudáveis e danificadas. O citocromo-c extracelular pode interagir com o TLR4 da microglia e modular funções inflamatórias dessas células imunes cerebrais (Gouveia et al., 2017). Dependendo de como o citocromo c é ativado, ele pode estar relacionado a várias doenças mitocondriais incluindo doenças neurodegenerativas (Guerra-Castellano et al., 2020).

Uma sobreposição entre a microglia ativada, citocinas pró-inflamatórias e um marcador do TSPO foi mostrada em alguns estudos de neurodegeneração em animais. Um estudo de meningite tuberculosa em coelhos, identificou o TSPO aumentado, através de um outro marcador, também *in vivo* com imagens PET detectando microglia/macrófagos ativados associados a infecção e desenvolvimento da meningite pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (Tucker et al., 2016). Esses achados foram traduzidos em estudos clínicos, onde um aumento de TSPO mostrado em PET ocorrem em áreas relevantes no SNC em um amplo espectro de doenças neurodegenerativas. Embora isso apoie o uso de TSPO PET como um biomarcador para monitorar a resposta em ensaios clínicos de novas terapias neurodegenerativas, a utilidade clínica dos radioligantes TSPO PET atuais foi prejudicada pela falta de ligação de alta afinidade a uma forma prevalente de TSPO polimórfico em comparação com o TSPO de tipo selvagem (Werry et al., 2019). Esta distribuição de afinidade de ligação pode ser prevista pela presença de um único polimorfismo de nucleotídeo (SNP) no gene TSPO. Este SNP rs6971 causa uma substituição não conservadora de alanina por treonina no 147º aminoácido (A147T) de TSPO. Este polimorfismo está presente em 30% dos caucasianos, 25% dos africanos, 4% dos japoneses e 2% dos chineses. Os pacientes que têm alta afinidade para ligantes de segunda geração são homozigotos para o TSPO de tipo selvagem, os pacientes com afinidade média são heterozigotos e os pacientes que têm afinidade baixa são homozigotos para o A147T TSPO (Owen et al., 2012; Guo et al., 2013).

Outra característica que vem sendo abordada nos estudos que utilizam o TSPO como possível biomarcador é que ele pode ter uma expressão oposta de acordo com o tipo de doença avaliada. Em uma revisão que avaliou essa disparidade na expressão do TSPO encontrou mais de quarenta estudos pré-clínicos e clínicos com a doença de Alzheimer, mostrando em geral que o TSPO é regulado positivamente, apesar das diferenças na topografia desse aumento, seu curso de tempo e os tipos de células associados. Já no caso da esquizofrenia, este mesmo estudo observou uma redução do TSPO, embora as evidências permaneçam escassas e contraditórias (Tournier et al., 2020). Além disso, um estudo em modelos de ratos com doença de Alzheimer prodrômica e acidente vascular cerebral subcortical agudo, apontou que o TSPO foi apenas expresso no insulto induzido por acidente vascular cerebral, que é uma forma mais aguda de inflamação e foi incapaz de detectar microglia ativada cronicamente (Al-Khishman et al., 2020).

O estudo atual demonstrou a presença de ativação microglial *in vivo* por imagem de ^{11}C -PBR28-PET. Além disso, os resultados também demonstraram a regulação positiva de TSPO, marcadores de estresse oxidativo e níveis de mediadores inflamatórios, não apenas no contexto agudo, mas também no contexto de longo prazo. Assim, em resumo, pode ser postulado que os efeitos regulatórios negativos dependentes de TSPO podem desempenhar um papel no comprometimento cognitivo que afeta ratos sobreviventes deste modelo experimental de meningite.

6 CONCLUSÃO

Fazendo uma abordagem translacional com os resultados deste estudo, conclui-se que a interação dinâmica entre as respostas imunes mediadas pela glia ativada por meio do mecanismo TSPO, sustenta o declínio cognitivo observado em sobreviventes de meningite. Assim, a PET com ^{11}C -PBR28 pode ser usado como um marcador de imagem para o monitoramento longitudinal da neuroinflamação em pacientes acometidos por meningite que apresentam comprometimento cognitivo progressivo de longo prazo.

As limitações do polimorfismo de TSPO podem ser contornadas pela genotipagem de TSPO rs6971 e excluindo indivíduos com o genótipo de ligação de baixa afinidade, que são mais raros, porém neste estudo com animais esta limitação não foi apresentada. Além disso, esses resultados também abrem um novo caminho para direcionar os ligantes de TSPO na disfunção cognitiva de longo prazo induzida por infecção.

REFERÊNCIAS

Abelli M, Chelli B, Costa B, Lari L, Cardini A, Gesi C, Muti M, Lucacchini A, Martini C, Cassano GB, Pini S. Reductions in platelet 18-kDa translocator protein density are associated with adult separation anxiety in patients with bipolar disorder. *Neuropsychobiology*. 2010;62(2):98-103.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.

Al-Khishman NU, Qi Q, Roseborough AD, Levit A, Allman BL, Anazodo UC, Fox MS, Whitehead SN, Thiessen JD. TSPO PET detects acute neuroinflammation but not diffuse chronically activated MHCII microglia in the rat. *EJNMMI Res*. 2020;10(1):113.

Albrecht DS, Granziera C, Hooker JM, Loggia ML. In Vivo Imaging of Human Neuroinflammation. *ACS Chem Neurosci*. 2016;7(4):470-83.

Anholt RR, Murphy KM, Mack GE, Snyder SH. Peripheral-type benzodiazepine receptors in the central nervous system: localization to olfactory nerves. *J Neurosci*. 1984;4(2):593-603.

Araki T, Ikegaya Y, Koyama R. The effects of microglia- and astrocyte-derived factors on neurogenesis in health and disease. *Eur J Neurosci*. 2021;54(5):5880-901.

Azam S, Haque ME, Kim IS, Choi DK. Microglial Turnover in Ageing-Related Neurodegeneration: Therapeutic Avenue to Intervene in Disease Progression. *Cells*. 2021;10(1):

Bae KR, Shim HJ, Balu D, Kim SR, Yu SW. Translocator protein 18 kDa negatively regulates inflammation in microglia. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2014;9(3):424-37.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987;32:279-312.

Barichello T, Generoso JS, Simoes LR, Elias SG, Tashiro MH, Dinguini D, Comim CM, Vilela MC, Teixeira AL, Quevedo J. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase prevented cognitive impairment in adult Wistar rats subjected to pneumococcal meningitis. *Transl Res*. 2013;162(6):390-7.

Barichello T, Goncalves JC, Generoso JS, Milioli GL, Silvestre C, Costa CS, Coelho Jda R, Comim CM, Quevedo J. Attenuation of cognitive impairment by the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin in Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis. *BMC Neurosci*. 2013;14:42.

Barichello T, Lemos JC, Generoso JS, Cipriano AL, Milioli GL, Marcelino DM, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Vilela MC, Teixeira AL. Oxidative stress, cytokine/chemokine and disruption of blood-brain barrier in neonate rats after meningitis by *Streptococcus agalactiae*. *Neurochem Res*. 2011;36(10):1922-30.

Barichello T, Simoes LR, Quevedo J, Zhang XY. Microglial Activation and Psychotic Disorders: Evidence from Pre-clinical and Clinical Studies. *Curr Top Behav Neurosci*. 2020;44:161-205.

Barichello T, Simões LR, Valvassori SS, Generoso JS, Aveline P, Dominguni D, Elias SG, Vilela MC, Quevedo J, Teixeira AL. *Klebsiella pneumoniae* meningitis induces memory impairment and increases pro-inflammatory host response in the central nervous system of Wistar rats. *J Med Microbiol*. 2014;63(Pt 1):111-7.

Batoko H, Veljanovski V, Jurkiewicz P. Enigmatic Translocator protein (TSPO) and cellular stress regulation. *Trends Biochem Sci*. 2015;40(9):497-503.

Beckers L, Ory D, Geric I, Declercq L, Koole M, Kassiou M, Bormans G, Baes M. Increased Expression of Translocator Protein (TSPO) Marks Pro-inflammatory Microglia but Does Not Predict Neurodegeneration. *Mol Imaging Biol*. 2018;20(1):94-102.

Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(13):7041-6.

Bifrare YD, Gianinazzi C, Imboden H, Leib SL, Täuber MG. Bacterial meningitis causes two distinct forms of cellular damage in the hippocampal dentate gyrus in infant rats. *Hippocampus*. 2003;13(4):481-8.

Bijlsma MW, Brouwer MC, Kasanmoentalib ES, Kloek AT, Lucas MJ, Tanck MW, Van Der Ende A, Van De Beek D. Community-acquired bacterial meningitis in adults in the Netherlands, 2006-14: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(3):339-47.

Bond PA, Cundall RL, Rolfe B. [³H] diazepam binding to human granulocytes. *Life Sci*. 1985;37(1):11-6.

Bonsack F, Sukumari-Ramesh S. TSPO: An Evolutionarily Conserved Protein with Elusive Functions. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):

Borba Filho GL, Zenki KC, Kalinine E, Baggio S, Pettenuzzo L, Zimmer ER, Weis SN, Calcagnotto ME, Onofre De Souza D. A new device for step-down inhibitory avoidance task--effects of low and high frequency in a novel device for passive inhibitory avoidance task that avoids bioimpedance variations. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116000.

Bourdiol F, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Scatton B. Increase in omega 3 (peripheral type benzodiazepine) binding sites in the rat cortex and striatum after local injection of interleukin-1, tumour necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Brain Res*. 1991;543(2):194-200.

Braestrup C, Albrechtsen R, Squires RF. High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. *Nature*. 1977;269(5630):702-4.

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

Brouwer MC, Van De Beek D. Epidemiology of community-acquired bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2018;31(1):78-84.

Buchholz G, Koedel U, Pfister HW, Kastenbauer S, Klein M. Dramatic reduction of mortality in pneumococcal meningitis. *Crit Care.* 2016;20(1):312.

Butovsky O, Weiner HL. Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19(10):622-35.

Cagnin A, Rossor M, Sampson EL, Mackinnon T, Banati RB. In vivo detection of microglial activation in frontotemporal dementia. *Ann Neurol.* 2004;56(6):894-7.

Cai J, Yang J, Jones DP. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1366(1-2):139-49.

Castelblanco RL, Lee M, Hasbun R. Epidemiology of bacterial meningitis in the USA from 1997 to 2010: a population-based observational study. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(9):813-9.

Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nunez G, Inohara N. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol.* 2003;4(7):702-7.

Chen S, Tang C, Ding H, Wang Z, Liu X, Chai Y, Jiang W, Han Y, Zeng H. Maf1 Ameliorates Sepsis-Associated Encephalopathy by Suppressing the NF- κ B/NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway. *Front Immunol.* 2020;11594071.

Clarke LE, Liddelow SA, Chakraborty C, Münch AE, Heiman M, Barres BA. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(8):E1896-e905.

Cohen SJ, Stackman RW, Jr. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav Brain Res.* 2015;285105-17.

Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol.* 2016;37(9):608-20.

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

Coughlin JM, Wang Y, Ambinder EB, Ward RE, Minn I, Vranesic M, Kim PK, Ford CN, Higgs C, Hayes LN, Schretlen DJ, Dannals RF, Kassiou M, Sawa A, Pomper MG. In vivo markers of inflammatory response in recent-onset schizophrenia: a combined

study using [(11)C]DPA-713 PET and analysis of CSF and plasma. *Transl Psychiatry*. 2016;6(4):e777.

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

Dandekar MP, Luse D, Hoffmann C, Cotton P, Peery T, Ruiz C, Hussey C, Giridharan VV, Soares JC, Quevedo J, Fenoy AJ. Increased dopamine receptor expression and anti-depressant response following deep brain stimulation of the medial forebrain bundle. *J Affect Disord*. 2017;21780-8.

Davies LP, Huston V. Peripheral benzodiazepine binding sites in heart and their interaction with dipyrindamole. *Eur J Pharmacol*. 1981;73(2-3):209-11.

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

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

Dell'osso L, Da Pozzo E, Carmassi C, Trincavelli ML, Ciapparelli A, Martini C. Lifetime manic-hypomanic symptoms in post-traumatic stress disorder: relationship with the 18 kDa mitochondrial translocator protein density. *Psychiatry Res*. 2010;177(1-2):139-43.

Di Biase MA, Zalesky A, O'keefe G, Laskaris L, Baune BT, Weickert CS, Olver J, Mccorry PD, Amminger GP, Nelson B, Scott AM, Hickie I, Banati R, Turkheimer F, Yaqub M, Everall IP, Pantelis C, Cropley V. PET imaging of putative microglial activation in individuals at ultra-high risk for psychosis, recently diagnosed and chronically ill with schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2017;7(8):e1225.

Díaz-Quintana A, Pérez-Mejías G, Guerra-Castellano A, De La Rosa MA, Díaz-Moreno I. Wheel and Deal in the Mitochondrial Inner Membranes: The Tale of Cytochrome c and Cardiolipin. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;20206813405.

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

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186421-31.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102(1):33-42.

Dupont AC, Largeau B, Santiago Ribeiro MJ, Guilloteau D, Tronel C, Arlicot N. Translocator Protein-18 kDa (TSPO) Positron Emission Tomography (PET) Imaging and Its Clinical Impact in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4):

Ellis J, Luintel A, Chandna A, Heyderman RS. Community-acquired acute bacterial meningitis in adults: a clinical update. *Br Med Bull*. 2019;131(1):57-70.

Engelen-Lee JY, Brouwer MC, Aronica E, Van De Beek D. Pneumococcal meningitis: clinical-pathological correlations (MeninGene-Path). *Acta Neuropathol Commun*. 2016;426.

Flannery BM, Bruun DA, Rowland DJ, Banks CN, Austin AT, Kukis DL, Li Y, Ford BD, Tancredi DJ, Silverman JL, Cherry SR, Lein PJ. Persistent neuroinflammation and cognitive impairment in a rat model of acute diisopropylfluorophosphate intoxication. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):267.

Gerber J, Bottcher T, Hahn M, Siemer A, Bunkowski S, Nau R. Increased mortality and spatial memory deficits in TNF-alpha-deficient mice in ceftriaxone-treated experimental pneumococcal meningitis. *Neurobiol Dis*. 2004;16(1):133-8.

Gerber J, Nau R. Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol*. 2010;23(3):312-8.

Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2006;21(2):404-12.

Gerhard A, Schwarz J, Myers R, Wise R, Banati RB. Evolution of microglial activation in patients after ischemic stroke: a [11C](R)-PK11195 PET study. *Neuroimage*. 2005;24(2):591-5.

Gouveia A, Bajwa E, Klegeris A. Extracellular cytochrome c as an intercellular signaling molecule regulating microglial functions. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017;1861(9):2274-81.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126(1):131-8.

Guerra-Castellano A, Márquez I, Pérez-Mejías G, Díaz-Quintana A, De La Rosa MA, Díaz-Moreno I. Post-Translational Modifications of Cytochrome c in Cell Life and Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):

Guo Q, Colasanti A, Owen DR, Onega M, Kamalakaran A, Bennacef I, Matthews PM, Rabiner EA, Turkheimer FE, Gunn RN. Quantification of the specific translocator protein signal of 18F-PBR111 in healthy humans: a genetic polymorphism effect on in vivo binding. *J Nucl Med*. 2013;54(11):1915-23.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):231-55.

Hanke ML, Kielian T. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*. 2011;121(9):367-87.

Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;125050-5.

Hasbun R, Rosenthal N, Balada-Llasat JM, Chung J, Duff S, Bozzette S, Zimmer L, Ginocchio CC. Epidemiology of Meningitis and Encephalitis in the United States, 2011-2014. *Clin Infect Dis*. 2017;65(3):359-63.

Heath PT, Okike IO, Oeser C. Neonatal meningitis: can we do better? *Adv Exp Med Biol*. 2011;71911-24.

Heiman A, Pallottie A, Heary RF, Elkabes S. Toll-like receptors in central nervous system injury and disease: a focus on the spinal cord. *Brain Behav Immun*. 2014;42232-45.

Hennessy E, Gormley S, Lopez-Rodriguez AB, Murray C, Murray C, Cunningham C. Systemic TNF- α produces acute cognitive dysfunction and exaggerated sickness behavior when superimposed upon progressive neurodegeneration. *Brain Behav Immun*. 2017;59233-44.

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

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

Idris N, Neill J, Grayson B, Bang-Andersen B, Witten LM, Brennum LT, Arnt J. Sertindole improves sub-chronic PCP-induced reversal learning and episodic memory deficits in rodents: involvement of 5-HT(6) and 5-HT (2A) receptor mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010;208(1):23-36.

Iovino F, Orihuela CJ, Moorlag HE, Molema G, Bijlsma JJ. Interactions between blood-borne *Streptococcus pneumoniae* and the blood-brain barrier preceding meningitis. *PLoS One*. 2013;8(7):e68408.

Janssen B, Vugts DJ, Funke U, Molenaar GT, Kruijer PS, Van Berckel BN, Lammertsma AA, Windhorst AD. Imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease, multiple sclerosis and stroke: Recent developments in positron emission tomography. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(3):425-41.

Ji J, Kline AE, Amoscato A, Samhan-Arias AK, Sparvero LJ, Tyurin VA, Tyurina YY, Fink B, Manole MD, Puccio AM, Okonkwo DO, Cheng JP, Alexander H, Clark RS, Kochanek PM, Wipf P, Kagan VE, Bayır H. Lipidomics identifies cardiolipin oxidation as a mitochondrial target for redox therapy of brain injury. *Nat Neurosci*. 2012;15(10):1407-13.

Johnson MR, Marazziti D, Brawman-Mintzer O, Emmanuel NP, Ware MR, Morton WA, Rossi A, Cassano GB, Lydiard RB. Abnormal peripheral benzodiazepine receptor density associated with generalized social phobia. *Biol Psychiatry*. 1998;43(4):306-9.

Johsrich KO, Zhou J, Law DK, St Michael F, Mccaw SE, Jamieson FB, Cox AD, Tsang RS, Gray-Owen SD. Invasive potential of nonencapsulated disease isolates of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*. 2012;80(7):2346-53.

Kambire D, Soeters HM, Ouedraogo-Traore R, Medah I, Sangare L, Yameogo I, Sawadogo G, Ouedraogo AS, Hema-Ouangraoua S, Mcgee L, Srinivasan V, Ake F, Congo-Ouedraogo M, Sanou S, Ba AK, Novak RT, Van Beneden C. Nationwide Trends in Bacterial Meningitis before the Introduction of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine-Burkina Faso, 2011-2013. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166384.

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011;91(2):461-553.

Kigerl KA, De Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol*. 2014;2585-16.

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

Kinnally KW, Zorov DB, Antonenko YN, Snyder SH, Mcenery MW, Tedeschi H. Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(4):1374-8.

Koedel U, Bayerlein I, Paul R, Sporer B, Pfister HW. Pharmacologic interference with NF-kappaB activation attenuates central nervous system complications in experimental Pneumococcal meningitis. *J Infect Dis*. 2000;182(5):1437-45.

Koedel U, Scheld WM, Pfister HW. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(12):721-36.

Kovacic P, Edwards WD, Ming G. Theoretical studies on mechanism of MPTP action: ET interference by MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridinium) with mitochondrial respiration vs. oxidative stress. *Free Radic Res Commun*. 1991;14(1):25-32.

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

Kreisl WC, Lyoo CH, Liow JS, Wei M, Snow J, Page E, Jenko KJ, Morse CL, Zoghbi SS, Pike VW, Turner RS, Innis RB. (11)C-PBR28 binding to translocator protein increases with progression of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2016;4453-61.

Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19(8):312-8.

Kruczek C, Görg B, Keitel V, Pirev E, Kröncke KD, Schliess F, Häussinger D. Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. *Glia*. 2009;57(1):79-92.

Kumar A, Williams MT, Chugani HT. Evaluation of basal ganglia and thalamic inflammation in children with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection and tourette syndrome: a positron emission tomographic (PET) study using ^{11}C -[R]-PK11195. *J Child Neurol*. 2015;30(6):749-56.

Kumar S, Ingle H, Prasad DV, Kumar H. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit Rev Microbiol*. 2013;39(3):229-46.

Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener*. 2020;9(1):42.

Lannes N, Eppler E, Etemad S, Yotovski P, Filgueira L. Microglia at center stage: a comprehensive review about the versatile and unique residential macrophages of the central nervous system. *Oncotarget*. 2017;8(69):114393-413.

Lavisse S, Guillermier M, Hérard AS, Petit F, Delahaye M, Van Camp N, Ben Haim L, Lebon V, Remy P, Dollé F, Delzescaux T, Bonvento G, Hantraye P, Escartin C. Reactive astrocytes overexpress TSPO and are detected by TSPO positron emission tomography imaging. *J Neurosci*. 2012;32(32):10809-18.

Lepennetier G, Hracsko Z, Unger M, Van Griensven M, Grummel V, Krumbholz M, Berthele A, Hemmer B, Kowarik MC. Cytokine and immune cell profiling in the cerebrospinal fluid of patients with neuro-inflammatory diseases. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):219.

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

Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(4):225-42.

Li XM, Meng J, Li LT, Guo T, Yang LK, Shi QX, Li XB, Chen Y, Yang Q, Zhao JN. Effect of ZBD-2 on chronic pain, depressive-like behaviors, and recovery of motor function following spinal cord injury in mice. *Behav Brain Res*. 2017;322(Pt A):92-9.

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

Liu X, Chauhan VS, Young AB, Marriott I. NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to *Streptococcus pneumoniae*. *Glia*. 2010;58(7):839-47.

Loschen G, Flohé L, Chance B. Respiratory chain linked H_2O_2 production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett*. 1971;18(2):261-4.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

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

Ma L, Zhang H, Liu N, Wang PQ, Guo WZ, Fu Q, Jiao LB, Ma YQ, Mi WD. TSPO ligand PK11195 alleviates neuroinflammation and beta-amyloid generation induced by systemic LPS administration. *Brain Res Bull.* 2016;121192-200.

Mcenery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(8):3170-4.

Mcgill F, Heyderman RS, Panagiotou S, Tunkel AR, Solomon T. Acute bacterial meningitis in adults. *Lancet.* 2016;388(10063):3036-47.

Mcneela AM, Bernick C, Hines RM, Hines DJ. TSPO regulation in reactive gliotic diseases. *J Neurosci Res.* 2018;96(6):978-88.

Meli DN, Coimbra RS, Erhart DG, Loquet G, Bellac CL, Tauber MG, Neumann U, Leib SL. Doxycycline reduces mortality and injury to the brain and cochlea in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun.* 2006;74(7):3890-6.

Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol.* 2001;101(3):249-55.

Möhler H, Okada T. Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science.* 1977;198(4319):849-51.

Møller K, Tofteng F, Qvist T, Sahl C, Sønderkaer S, Pedersen BK. Cerebral output of cytokines in patients with pneumococcal meningitis. *Crit Care Med.* 2005;33(5):979-83.

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

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

Nau R, Soto A, Bruck W. Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999;58(3):265-74.

Nudmamud S, Siripurkpong P, Chindaduangratana C, Harnyuttanakorn P, Lotrakul P, Laarbboonsarp W, Srikiatkhachorn A, Kotchabhakdi N, Casalotti SO. Stress, anxiety and peripheral benzodiazepine receptor mRNA levels in human lymphocytes. *Life Sci.* 2000;67(18):2221-31.

Orrenius S, Zhivotovsky B. Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free. *Nat Chem Biol.* 2005;1(4):188-9.

Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(7):532-42.

Owen DR, Yeo AJ, Gunn RN, Song K, Wadsworth G, Lewis A, Rhodes C, Pulford DJ, Bennacef I, Parker CA, Stjean PL, Cardon LR, Mooser VE, Matthews PM, Rabiner EA, Rubio JP. An 18-kDa translocator protein (TSPO) polymorphism explains differences in binding affinity of the PET radioligand PBR28. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(1):1-5.

Panato AP, Tomasi LT, Simon CS, Madeira K, Simoes LR, Medeiros LR, Barichello T, Rosa MI. Meta-analysis identifies tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta as diagnostic biomarkers for bacterial and aseptic meningitis. *Curr Neurovasc Res.* 2014;11(4):340-8.

Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(8):402-9.

Papadopoulos V, Fan J, Zirkin B. Translocator protein (18 kDa): an update on its function in steroidogenesis. *J Neuroendocrinol.* 2018;30(2):

Papadopoulos V, Lecanu L. Translocator protein (18 kDa) TSPO: an emerging therapeutic target in neurotrauma. *Exp Neurol.* 2009;219(1):53-7.

Paradies G, Petrosillo G, Ruggiero FM. Cardiolipin-dependent decrease of cytochrome c oxidase activity in heart mitochondria from hypothyroid rats. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1319(1):5-8.

Park CH, Carboni E, Wood PL, Gee KW. Characterization of peripheral benzodiazepine type sites in a cultured murine BV-2 microglial cell line. *Glia.* 1996;16(1):65-70.

Park J, Min JS, Kim B, Chae UB, Yun JW, Choi MS, Kong IK, Chang KT, Lee DS. Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- κ B pathways. *Neurosci Lett.* 2015;584:191-6.

Polkowska A, Toropainen M, Ollgren J, Lyytikainen O, Nuorti JP. Bacterial meningitis in Finland, 1995-2014: a population-based observational study. *BMJ Open.* 2017;7(5):e015080.

Prasad R, Kapoor R, Srivastava R, Mishra OP, Singh TB. Cerebrospinal fluid TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in children with bacterial meningitis. *Pediatr Neurol.* 2014;50(1):60-5.

Quagliarello VJ, Wispelwey B, Long WJ, Jr., Scheld WM. Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat.

Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest.* 1991;87(4):1360-6.

Radin JN, Orihuela CJ, Murti G, Guglielmo C, Murray PJ, Tuomanen EI. beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2005;73(12):7827-35.

Raghavendra Rao VL, Dogan A, Bowen KK, Dempsey RJ. Traumatic brain injury leads to increased expression of peripheral-type benzodiazepine receptors, neuronal death, and activation of astrocytes and microglia in rat thalamus. *Exp Neurol.* 2000;161(1):102-14.

Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:119-45.

Rey C, Mauduit C, Naureils O, Benahmed M, Louisot P, Gasnier F. Up-regulation of mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor expression by tumor necrosis factor alpha in testicular leydig cells. Possible involvement in cell survival. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(11):1639-46.

Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest.* 1998;102(2):347-60.

Rocca P, Bellone G, Benna P, Bergamasco B, Ravizza L, Ferrero P. Peripheral-type benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity distribution in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacology.* 1993;25(2):163-78.

Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE, Stetler-Stevenson WG. Tumor necrosis factor-alpha-induced gelatinase B causes delayed opening of the blood-brain barrier: an expanded therapeutic window. *Brain Res.* 1995;703(1-2):151-5.

Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G, Baghai TC, Fan J, Akula N, Groyer G, Adams D, Schumacher M. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(12):971-88.

Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):775-87.

Sandiego CM, Gallezot JD, Pittman B, Nabulsi N, Lim K, Lin SF, Matuskey D, Lee JY, O'connor KC, Huang Y, Carson RE, Hannestad J, Cosgrove KP. Imaging robust microglial activation after lipopolysaccharide administration in humans with PET. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(40):12468-73.

Sarubin N, Baghai TC, Lima-Ojeda JM, Melchner D, Hallof-Buestrich H, Wolf L, Hilbert S, Milenkovic VM, Wetzel CH, Rupprecht R, Nothdurfter C. Translocator Protein (TSPO) Expression in Platelets of Depressed Patients Decreases during Antidepressant Therapy. *Pharmacopsychiatry.* 2016;49(5):204-9.

Scaini G, Fries GR, Valvassori SS, Zeni CP, Zunta-Soares G, Berk M, Soares JC, Quevedo J. Perturbations in the apoptotic pathway and mitochondrial network dynamics in peripheral blood mononuclear cells from bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry*. 2017;7(5):e11111.

Scheld WM, Koedel U, Nathan B, Pfister HW. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury. *J Infect Dis*. 2002;186 Suppl 2S225-33.

Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun*. 1992;17(4):221-37.

Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science*. 2010;327(5963):296-300.

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

Semmler A, Okulla T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Heneka MT. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J Chem Neuroanat*. 2005;30(2-3):144-57.

Semmler A, Widmann CN, Okulla T, Urbach H, Kaiser M, Widman G, Mormann F, Weide J, Fliessbach K, Hoeft A, Jessen F, Putensen C, Heneka MT. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(1):62-9.

Setiawan E, Attwells S, Wilson AA, Mizrahi R, Rusjan PM, Miller L, Xu C, Sharma S, Kish S, Houle S, Meyer JH. Association of translocator protein total distribution volume with duration of untreated major depressive disorder: a cross-sectional study. *Lancet Psychiatry*. 2018;5(4):339-47.

Shen Z, Bao X, Wang R. Clinical PET Imaging of Microglial Activation: Implications for Microglial Therapeutics in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2018;10314.

Sies H. Biological redox systems and oxidative stress. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(17):2181-8.

Simoes LR, Abreu R, Generoso JS, Goularte JA, Collodel A, Giridharan VV, Arumanayagam ACS, Valvassori SS, Quevedo J, Barichello T. Prevention of Memory Impairment and Neurotrophic Factors Increased by Lithium in Wistar Rats Submitted to Pneumococcal Meningitis Model. *Mediators Inflamm*. 2017;20176490652.

Sinan SDIDaDN-. Meningite. 2017. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/meningite>>. Acesso em: October 31.

Skovira JW, Wu J, Matyas JJ, Kumar A, Hanscom M, Kabadi SV, Fang R, Faden AI. Cell cycle inhibition reduces inflammatory responses, neuronal loss, and cognitive

deficits induced by hypobaric exposure following traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):299.

Squire LR, Zola-Morgan M, Clark RE. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(11):872-83.

Srivastava R, Lohokare R, Prasad R. Oxidative stress in children with bacterial meningitis. *J Trop Pediatr*. 2013;59(4):305-8.

Subramanyam CS, Wang C, Hu Q, Dheen ST. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;94:112-20.

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

Toth M, Doorduyn J, Haggkvist J, Varrone A, Amini N, Halldin C, Gulyas B. Positron Emission Tomography studies with [¹¹C]PB28 in the Healthy Rodent Brain: Validating SUV as an Outcome Measure of Neuroinflammation. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125917.

Tournier BB, Tsartsalis S, Ceyzériat K, Garibotto V, Millet P. In Vivo TSPO Signal and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Cells*. 2020;9(9):

Tucker EW, Pokkali S, Zhang Z, Demarco VP, Klunk M, Smith ES, Ordonez AA, Penet MF, Bhujwala Z, Jain SK, Kannan S. Microglia activation in a pediatric rabbit model of tuberculous meningitis. *Dis Model Mech*. 2016;9(12):1497-506.

Twiddy D, Brown DG, Adrain C, Jukes R, Martin SJ, Cohen GM, Macfarlane M, Cain K. Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/caspase-9 apoptosome complex. *J Biol Chem*. 2004;279(19):19665-82.

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

Van De Beek D, Brouwer M, Hasbun R, Koedel U, Whitney CG, Wijdicks E. Community-acquired bacterial meningitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16074.

Van De Beek D, Drake JM, Tunkel AR. Nosocomial bacterial meningitis. *N Engl J Med*. 2010;362(2):146-54.

Veenman L, Shandalov Y, Gavish M. VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis. *J Bioenerg Biomembr*. 2008;40(3):199-205.

Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA. The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: from pathology to imaging. *Prog Neurobiol*. 2006;80(6):308-22.

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

Wang H, Zhang J, Wu H, Jiang C, Zheng Q, Li Z. Inhibition of RAW264.7 macrophage inflammatory cytokines release by small hairpin RNAi targeting TLR4. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2006;26(5):500-3.

Wang X, Yang J, Xing Z, Zhang H, Wen Y, Qi F, Zuo Z, Xu J, Yao Z. IL-4 mediates the delayed neurobehavioral impairments induced by neonatal hepatitis B vaccination that involves the down-regulation of the IL-4 receptor in the hippocampus. *Cytokine.* 2018;110:137-49.

Werry EL, Bright FM, Piguet O, Ittner LM, Halliday GM, Hodges JR, Kiernan MC, Loy CT, Kril JJ, Kassiou M. Recent Developments in TSPO PET Imaging as A Biomarker of Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):

Witzenrath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, Van Der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2011;187(1):434-40.

Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:619-43.

Zhou T, Dang Y, Zheng YH. The mitochondrial translocator protein, TSPO, inhibits HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis via the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway. *J Virol.* 2014;88(6):3474-84.

Zurcher NR, Loggia ML, Lawson R, Chonde DB, Izquierdo-Garcia D, Yasek JE, Akeju O, Catana C, Rosen BR, Cudkovicz ME, Hooker JM, Atassi N. Increased in vivo glial activation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: assessed with [(11)C]-PBR28. *Neuroimage Clin.* 2015;7:409-14.

ANEXOS

Anexo 1 – Carta de aprovação CEUA/UNESC



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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Meningite, neuroinflamação e demencia: inibição da proteína translocadora mitocondrial (TSPO) como nova abordagem terapêutica**", registrada com o protocolo nº 032/2017-1, sob a responsabilidade de **Josiane Budni**, junto à equipe: Allan Minatto Collodel, Cassia Pereira Rafael, Chayelle Raupp Rodrigues Pereira, Gustavo Sangiogo, Jaqueline da Silva Generoso, Jéssica Goularte, Lutiana Roque Simões - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **02/05/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/06/2017 a 30/06/2018
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	388
Idade/Peso	60 dias / 250 – 300g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério UNESC

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

Project title: "**Meningitis, neuroinflammation, and dementia: inhibition of mitochondrial translocatory protein (TSPO) as a new therapeutic approach**"

Protocol number: 032/2017-1

Principal Investigator: **Josiane Budni**

Researchers: **Allan Minatto Collodel, Cassia Pereira Rafael, Chayelle Raupp Rodrigues Pereira, Gustavo Sangiogo, Jaqueline da Silva Generoso, Jéssica Goularte, Lutiana Roque Simões.**

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

Criciúma, 02 de maio de 2017.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA

Anexo 2 – Carta de aprovação UTHealth



Animal Welfare Committee

7000 Fannin Street, Suite 1870
Houston, Texas 77030

APPROVAL – ANIMAL PROTOCOL: NON-USDA SPECIES September 29, 2016

AWC-15-0099 – “Acute phase meningitis survivor rat brain imaging by Positron Emission Tomography (PET).”

PI: Tatiana Barichello, Ph.D.

SPECIES: Rat

PAIN CLASSIFICATION: E

NUMBER OF ANIMALS APPROVED: 91

FUNDING AGENCY: Psychiatry/Behavioral Sciences

PROVISIONS: Please contact the veterinary staff prior to initiating each study (One and Two) so that the veterinarian can closely assess the clinical condition of the animals during the initial animal studies.

APPROVED: Designated Member Review

ORIGINAL APPROVAL DATE: 09/29/2016

EXPIRATION DATE: 08/31/2019

CHAIRPERSON: Diane L. Bick, Ph.D. 

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

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

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

ADVERSE EVENTS/UNANTICIPATED PROBLEMS - It is the responsibility of the PI to report to the veterinarian and the AWC any unexpected outcomes (abnormal phenotypes, increased toxicity of substance, surgical complications, etc.) that have resulted in jeopardizing the welfare

of the animals in excess of what was explained in the protocol. An Adverse Event/Unanticipated Problems/Protocol Deviation form is available on the AWC/CLAMC [website](#). Please complete and submit to awc@uth.tmc.edu.

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

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

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

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

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