

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
UNIDADE ACADEMICA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – UNASAU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS

ERALDO BELARMINO JUNIOR

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E DOS NÍVEIS DO FATOR
NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO EM RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS À MENINGITE NO PERÍODO NEONATAL**

CRICIÚMA, OUTUBRO DE 2011

ERALDO BELARMINO JUNIOR

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E DOS NÍVEIS DO FATOR
NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO EM RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS À MENINGITE NO PERÍODO NEONATAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Tatiana Barichello

CRICIÚMA, OUTUBRO DE 2011

Dedico este trabalho a minha esposa Raquel e meus filhos Maria Carolina, Roberto e Cecília, que foram à base para concluir mais essa etapa em minha vida. E a todas as pessoas que não mediram tempo e nem esforços para me ajudar nesta conquista tão importante.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força, coragem suficiente e me iluminou para realizar essa etapa com muita persistência para que pudesse concluir mais um sonho em minha vida.

A minha família, minha mãe Gessy, meu irmão Alexanders e minha irmã Ana Isabela, que sempre me incentivam e apoiam.

Agradeço em especial a minha orientadora e professora Tatiana Barichello, pelo tempo disponibilizado com muito carinho e dedicação. Por passar todos seus conhecimentos para concluir esse trabalho. Por sua humildade, paciência, comprometimento, e por me delegar responsabilidades confiando em mim. A ela o meu muito obrigado.

Agradeço a todos os colegas do grupo de pesquisa, Ana Paula Moreira, Jaqueline da Silva Generoso, Allan Collodel, Grazielle Milioli, Cintia Silvestre, Caroline Costa, Mirelle Carradore, Jessiele Ramos Zanatta e aos professores Cleonice Maria Michelin e Paulo Barbosa, que contribuíram de uma forma muito especial nesse trabalho.

Em especial agradeço a farmacêutica Ana Paula Panatto, por disponibilizar seu tempo, conhecimento para auxiliar, com muito carinho e deste modo quero dizer que esta dissertação foi construída em quatro mãos.

A todos os professores e colegas do Mestrado pelos ensinamentos que contribuíram para meu conhecimento.

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram de uma forma direta ou indiretamente nessa caminhada.

Muito Obrigado!!!!

Para Eraldo Belarmino,
in memoriam

Preciso Me Encontrar

Cartola

Deixe-me ir
Preciso andar
Vou por aí a procurar
Rir prá não chorar
Deixe-me ir
Preciso andar
Vou por aí a procurar
Rir prá não chorar...

Quero assistir ao sol nascer
Ver as águas dos rios correr
Ouvir os pássaros cantar
Eu quero nascer
Quero viver...

Deixe-me ir
Preciso andar
Vou por aí a procurar
Rir prá não chorar
Se alguém por mim perguntar
Diga que eu só vou voltar
Depois que me encontrar...

Quero assistir ao sol nascer
Ver as águas dos rios correr
Ouvir os pássaros cantar
Eu quero nascer
Quero viver...

Deixe-me ir
Preciso andar
Vou por aí a procurar
Rir prá não chorar...

Deixe-me ir preciso andar
Vou por aí a procurar
Sorrir prá não chorar
Deixe-me ir preciso andar
Vou por aí a procurar
Rir prá não chorar...

RESUMO

As infecções do SNC continuam sendo uma importante causa de mortalidade e morbidade no mundo todo, especialmente em recém-nascidos e crianças. A meningite bacteriana neonatal ocorre entre o nascimento e o vigésimo oitavo dia de vida, sendo caracterizada por uma intensa inflamação, afetando a pia-máter, a aracnóide e o espaço subaracnóideo, gerando desta forma, complexos cerebrais que causam prejuízos neuropsicológicos e cognitivos através de uma reação inflamatória e apoptótica, independente do microrganismo patogênico. O objetivo deste estudo foi avaliar a memória aversiva, a memória de habituação e os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo de ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica no período neonatal. *Streptococcus pneumoniae* foi cultivado durante a noite em 10 mL de caldo de Todd-Hewitt, diluído em meio a fresco e obtido crescimento até a fase logarítmica de crescimento. A cultura foi centrifugada por 10 minutos a $5000 \times g$ e ressuspensa em salina estéril até a concentração desejada de 1×10^6 UFC/mL. Os animais, ratos Wistar recém nascidos (3-4 dias de vida), foram submetidos à punção na cisterna magna com uma agulha calibre 23. A posição da agulha foi verificada pelo fluxo livre do LCR cerebral. Os animais foram divididos em dois grupos que receberam 10 μ L de salina estéril (grupo sham $n=12$) ou volume equivalente da suspensão de *S. pneumoniae* (grupo meningite $n=19$). Após a inoculação, todos os animais receberam reposição de líquidos. A confirmação da meningite foi feita em 16 h após a indução por cultura quantitativa de 5 μ L de LCR obtidos por punção da cisterna magna, seguido do início do tratamento com antimicrobiano em ambos os grupos (ceftriaxona, 100 mg/kg) por 7 dias. A mortalidade no grupo sham foi de 16,6% e no grupo meningite 47,3%. Sessenta dias após a indução, os animais foram submetidos a dois testes comportamentais: habituação ao campo aberto e esQUIVA inibitória. Imediatamente após os testes comportamentais, os animais foram mortos e o hipocampo foi removido e armazenado a -80°C . Os níveis de BDNF no hipocampo foram quantificados utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) e protocolos padrão. Na tarefa de habituação ao campo aberto não houve diferença entre as sessões treino e teste no número de crossing e rearings no grupo meningite ($p=0.0612$ e $p=0.0692$ respectivamente). O grupo sham apresentou diferença significativa entre as sessões treino e teste no número de crossing e rearings ($p=0.0001$). Na tarefa de esQUIVA inibitória, o grupo sham apresentou significativas diferenças no tempo de latência entre treino e teste ($p=0.001$), já no grupo meningite não houve diferença entre o tempo de latência no treino e teste ($p=0.077$). Houve uma diminuição nos níveis de BDNF no hipocampo de ratos submetidos à meningite em relação ao grupo sham. Nossos resultados indicam que a diminuição dos níveis de BDNF hipocampal está relacionada ao prejuízo na memória de habituação neste modelo animal utilizando ratos adultos submetidos à meningite neonatal. Este estudo pode ser uma ferramenta útil para avaliar os déficits comportamentais futuros decorrentes da meningite no período neonatal.

Palavras chave: meningite; *Streptococcus pneumoniae*; neonatos; BDNF.

ABSTRACT

The Central Nervous System (CNS) infections remain a major cause of morbidity and mortality worldwide, especially in infants and children. The neonatal bacterial meningitis occurs between birth and twenty-eighth day of track and is characterized by intense inflammation affecting piamater, the arachnoid and the subarachnoid space, thereby generating complex brain that cause cognitive and neuropsychological impairments through an inflammatory reaction and apoptotic regardless of the pathogenic microorganism. The aim of this study was to evaluate aversive memory and memory of habituation, and brain-derived neurotrophic factor levels (BDNF) in the hippocampus of adult rats submitted to pneumococcal meningitis in the neonatal period. *Streptococcus pneumoniae* was grown overnight in 10 ml of Todd-Hewitt broth, diluted in fresh medium and obtained growth to logarithmic phase. The culture was centrifuged for 10 minutes at $5000 \times g$ and resuspended in sterile saline until the desired concentration of 1×10^6 CFU/mL. Animals, newborn rats (3-4 days old) were subjected to puncture the cisterna magna with a needle number 23. The needle position was verified by free flow of CSF brain. The animals were divided into two groups receiving 10 μ L of sterile saline (sham group n = 12) or equivalent volume of the suspension of *S. pneumoniae* (meningitis group n = 19). After inoculation, all animals received fluid replacement. The confirmation of meningitis was made at 16 hours after induction by quantitative culture of 5 μ L of cerebral spinal fluid (CSF) obtained by puncture of the cisterna magna, followed by the start of antimicrobial treatment in both groups (Ceftriaxone 100 mg/kg) for 7 days. The mortality in the sham group was 16.6% and in 47.3% meningitis group. Sixty days after the induction the animals were subjected to two behavioral tests: habituation to the open field and inhibitory avoidance task, immediately after the behavioral tests the animals were killed and the hippocampus was removed and stored at -80°C . The BDNF levels in the hippocampus were quantified using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and standard protocols. In the habituation to the open field task there was no difference between training and testing sessions in the number of crossing and rearings in meningitis group ($p = 0.0612$ and $p = 0.0692$ respectively). The sham group showed a significant difference between training and test session in the number of crossing and rearings ($p = 0.0001$). In the inhibitory avoidance task, the sham group showed significant differences in latency time between training and testing ($p = 0.001$), as meningitis group there was no difference between the lag time in training and testing ($p = 0,077$). There was a decrease in the BDNF levels in the hippocampus of rats with meningitis compared to the sham group. Our results indicated a decreased hippocampal BDNF levels can be related to memory impairment of adult rats subjected to neonatal meningitis. This study is a useful model for studying long-term behavioral deficits resulting from meningitis in the neonatal period.

Key-words: meningitis; *Streptococcus pneumoniae*; neonates; BDNF

LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES

Tabela1. Diagnóstico Diferencial do Líquor nas Meningites	16
Figura 1. Fisiopatologia da Meningite Bacteriana.	22
Figura 2. Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro.....	25
Figura 3. Fotografia do Aparato Habituação ao Campo Aberto.....	26
Figura 4. Fotografia do Aparato Esquiva Inibitória.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF- Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BHE - Barreira Hematoencefálica

DPI - Doença Pneumocócica Invasiva

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

IL-1 β - Interleucina-1 β

IL-6 - Interleucina-6

IL-8- Interleucina-8

NGF- Fator de Crescimento Neuronal

NK-kB - Fator Nuclear Kappa B

NT-3 - Neurotrofina-3

NT-4/5- Neurotrofina-4/5

NT-6 - Neurotrofina-6

NT-7 - Neurotrofina-7

PAF- Fator Ativador de Plaquetas

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP- Sistema Nervoso Periférico

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TrK - Tirosina-Quinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Meningite.....	11
1.2 Epidemiologia.....	12
1.3 Sinais e Sintomas	14
1.4 Diagnóstico Laboratorial	16
1.5 Tratamento.....	167
1.6 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	188
1.7 Fisiopatologia	199
1.8 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)	233
1.9 Testes comportamentais	255
1.10 Considerações	288
2 OBJETIVOS.....	299
2.1 Objetivo Geral.....	299
2.2 Objetivos Específicos	299
3 DISCUSSÃO.....	300
4 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Meningite

A meningite bacteriana é a síndrome infecciosa mais comum do sistema nervoso central (SNC) caracterizada como uma inflamação das meninges (THOMAS *et al.*, 2002; VAN DE BEEK *et al.*, 2006), afetando a pia-máter, aracnóide e espaço subaracnóide (KIM, 2010), gerando desta forma complexos cerebrais que causam prejuízos neuropsicológicos e cognitivos, através de uma reação inflamatória e apoptótica, independente do microrganismo patogênico (LEIB *et al.*, 1996; KOEDEL & PFISTER, 1999; NAU *et al.*, 1999; IRAZUZTA *et al.*, 2005). A resposta inflamatória do hospedeiro ocorre com o aumento de granulócitos e neutrófilos, os quais são potenciais geradores de espécies reativas de oxigênio (ERO) (KONTOS *et al.*, 1992) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), (LEIB *et al.*, 1996; KOEDEL & PFISTER, 1999; NAU *et al.*, 1999; IRAZUZTA *et al.*, 2005), inflamação dos vasos do parênquima cerebral (vasculite) e do ouvido interno. Esta intensa reação inflamatória é potencialmente fatal para o paciente, contribuindo para o desenvolvimento de lesão cerebral e sequelas neurofuncionais (TUNKELL & SCHELD, 1993).

Em tecidos cerebrais de pacientes *post mortem* foram verificados danos no SNC, caracterizados por apoptose no giro denteado hipocampal, responsável clinicamente por déficits de aprendizagem (GRANDGIRARD & LEIB, 2006), necrose tecidual nos hemisférios corticais, responsável ainda por isquemia e produção de ERO (NAU *et al.*, 1999). A inflamação no espaço ventricular e subaracnóide é responsável por muitas das consequências fisiopatológicas da doença (TUOMANEN, 1994; PFISTER *et al.*, 1999), sendo que a terapia antimicrobiana é parcialmente efetiva na prevenção de morte e desenvolvimento de sequelas neurológicas em pacientes com meningite bacteriana (DAOUD *et al.*, 1995; GOETGHEBUER *et al.*, 2000; LEIB *et al.*, 2003).

As infecções do SNC continuam sendo uma importante causa de mortalidade e morbidade no mundo todo, especialmente em recém-nascidos e crianças (HAUSSEN *et al.*, 2005; KIM, 2008). A meningite bacteriana está entre as dez causas de infecções relacionadas com morte. A taxa de morbidade e

mortalidade varia de acordo com a idade, o estado imunológico, o patógeno e a localização geográfica do paciente (KIM, 2008). Esses fatores são importantes, pois mostram grande influência no prognóstico (LIBERALESSO *et al.*, 2009). Os principais agentes que infectam os recém-nascidos são *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* e bacilos gram-negativos, enquanto *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* do tipo b são os microrganismos mais comuns da meningite bacteriana aguda em crianças pequenas e adultos (PELTOLA, 2000; WEISFELT *et al.*, 2006). *L. monocytogenes* afeta preferencialmente mulheres grávidas, puérperas, recém-nascidos, pacientes imunocomprometidos e aqueles com mais de 60 anos de idade (BROUWER *et al.*, 2009). A meningite ocasionada pelo *S. pneumoniae* leva à infecção aguda mais severa do SNC (MOLYNEUX *et al.*, 2002; DE GANS; VAN DE BEEK, 2009; BRANDT, 2010), representando 61% do total de casos nos Estados Unidos e Europa. No mundo em desenvolvimento, a meningite pneumocócica invasiva é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, com um número estimado de 0,7-1,0 milhão de mortes anuais entre crianças menores de 5 anos de idade. Estes dados indicam a necessidade do desenvolvimento de programas de imunização, especialmente nos países em desenvolvimentos e com maior índice de pobreza, afim de reduzir essas taxas (BROUWER *et al.*, 2010).

1.2 Epidemiologia

Em todo o mundo, a meningite bacteriana representa uma patologia muito importante, sendo considerada uma doença grave e com alta incidência de mortalidade e morbidade (WENGER *et al.*, 1990). É um problema ainda mais grave naqueles países de baixo nível sócio econômico. A taxa de letalidade é de 4,5% em países desenvolvidos e pode variar de 15% até 50% nos países de baixa renda (DE GANS & VAN BEEK, 2002; MOLYNEUX *et al.*, 2002; BRANDT, 2010).

No mundo estima-se que 171.000 mortes são ocasionadas anualmente por meningite bacteriana, sendo a incidência em adultos de 4 a 6 casos por 100.000 habitantes (HOOGMAN *et al.*, 2007). A incidência anual nos Estados Unidos oscila entre 3 a 6 casos por 100.000 habitantes, embora esse número varie conforme a

idade, a raça e o sexo (CHOIC, 2001). Em Dakar, no Senegal, entre os anos de 1970 à 1979, a incidência média foi de 50 casos por 100.000 habitantes, com cerca de 1 em 250 crianças com desenvolvimento de meningite bacteriana durante o primeiro ano de vida (BRAUWER *et al.*, 2010). A África Subsaariana, conhecida como o cinturão da meningite, também é conhecida por epidemias de meningite, com taxas de incidência de 101 casos por 100.000 habitantes no período de 1981 a 1996 (CAMPAGNE *et al.*, 1999).

Estimativas globais para o ano de 2000 relataram uma incidência de 31 casos de meningite por *H. influenzae* tipo b para cada 100.000 crianças menores de cinco anos de idade (WATT *et al.*, 2009). A taxa média de letalidade mundial foi de 43%, na África a incidência foi de 46 casos por 100.000 habitantes e a taxa média de letalidade saltou alarmantemente para 67%, sendo que dos casos fatais de meningite por *H. influenzae* tipo b em todo o mundo, estima-se que cerca da metade ocorreram na África. Em uma pesquisa similar para a meningite pneumocócica em crianças menores de cinco anos de idade, a taxa de incidência global foi de 17 casos para 100.000 habitantes (38 para a África) e a taxa média de letalidade foi de 59% (73% para a África). Em todo o mundo, 65 mil crianças morreram de meningite pneumocócica, sendo que 31.700 dessas mortes foram na África (O'BRIEN *et al.*, 2009). Nos países Africanos, onde os índices do vírus da imunodeficiência humana (HIV) são altos, a maioria dos casos de meningite são causados por *S. pneumoniae*, e este tem sido associado com alta taxa de mortalidade (BRAUWER *et al.*, 2010).

No Brasil por sua vez, o pneumococo é a segunda maior causa de meningites bacterianas. Entre 2000 e 2008, manteve-se a média anual de 1.250 casos de meningite pneumocócica e de 370 óbitos por ano. Em 2009, os estados com maior incidência de notificações de meningite pneumocócica foram São Paulo, com 268 casos, Minas Gerais com 92 casos e Bahia com 57 casos. No primeiro semestre do ano de 2011 foram confirmados 8.676 casos de meningite no Brasil, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Do total de casos, 37% foram registrados como etiologia bacteriana, 41% como meningite viral, 17% meningite não especificada e 3% de meningite por outra etiologia. Entre os casos de meningite bacteriana, 35% foram confirmados como sendo doença meningocócica, 43% como meningites por outras bactérias e 15% como meningite pneumocócica. E nos casos em menores de dois anos de idade foram confirmados 1.570 casos de meningites. Esses casos representam 18% do total de casos de meningite

considerando todas as faixas etárias. Do total de casos, 37% foram registrados como etiologia bacteriana, 41% meningite viral, 19% meningite não especificada e 1% de meningite por outra etiologia. Entre os casos de meningite bacteriana, 34% foram confirmados como sendo doença meningocócica, 47% como meningites por outras bactérias e 13% como meningite pneumocócica (SVS, 2011).

Estudo realizado no Brasil, na cidade de Curitiba, entre abril de 2001 e agosto de 2002, com um número de 100 pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado de meningite causada por *S. pneumoniae* demonstrou uma resistência à penicilina em 15% das cepas (ROSSONI *et al.*, 2008),

1.3 Sinais e Sintomas

A meningite bacteriana em humanos causa sequelas a longo prazo, incluindo déficit sensório motor e convulsões (BEDFORD *et al.*, 2001; GIANINAZZI *et al.*, 2003), apresentando taxas de mortalidade de até 30% e prejuízo de aprendizagem e memória em até 50% dos sobreviventes (GRANDGIRARD *et al.*, 2007; BELLAC *et al.*, 2007). Em um estudo com 116 crianças com idades entre 28 dias e 2 anos, diagnosticadas com meningite bacteriana, foram demonstrados que os sinais e sintomas mais frequentes foram febre (97,4%); vômitos (75,9%); rigidez da nuca (72,4%); diminuição do nível de consciência (36,2%); convulsões (34,5%); sinal de Brudzinski (29,3%); síndrome do neurônio motor superior (27,6%); sinal de Kerning (9,5%); alteração nos nervos cranianos (8,6%); síndrome cerebelar (7,8%); síndrome de hipertensão intracraniana (5,3%), sinal de Lasegue (3,4%); síndrome extrapiramidal (1,7%). Sendo que os sintomas que predominaram foram febre, cefaléia e vômitos (LIBERALESSO *et al.*, 2009). Adultos apresentam predominantemente um dos três sinais: febre, rigidez de nuca e estado mental alterado (CHOIC, 2001).

Foram avaliadas, em outro estudo, 81 crianças com meningite bacteriana com idade média de 7,5 anos, sendo demonstrado que 18,5% evoluíram com complicações neurológicas, sendo as mais frequentes convulsões (9,9%), isquemia cerebral (6,2%), hidrocefalia (4,9%) e síndrome da secreção inapropriada do hormônio antidiurético (3,7%). As sequelas neurológicas relacionadas com a

meningite bacteriana estão fortemente relacionadas com a idade das crianças. As complicações mais comuns em crianças menores de 2 anos de idade são atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, hidrocefalia e convulsões, enquanto em crianças com mais de 18 meses, as complicações mais frequentes são surdez e convulsão (DAVENPORT *et al.*, 2007).

van de Beek e co-autores (2004) avaliaram 696 casos de pacientes com meningite bacteriana aguda adquirida nos países baixos de outubro de 1998 a abril de 2002. O patógeno mais comum foi *S. pneumoniae* com 51% dos casos. A febre, rigidez de nuca e estado mental alterado estava presente em 44% dos casos. No entanto, 95% tiveram pelo menos dois dos quatro sintomas: cefaléia, febre, rigidez de nuca e estado mental alterado.

A meningite bacteriana neonatal ocorre entre o nascimento e o vigésimo oitavo dia de vida (HAUSSEN *et al.*, 2005). Recém nascidos de baixo peso apresentam um risco três vezes maior de contrair meningite, quando comparado aqueles cujo peso ao nascer é ≥ 2500 g (KREBS & COSTA, 2007). Os achados clínicos mais frequentes são difíceis de especificar, especialmente no período imediato pós-lesão (IRAZUZTA *et al.*, 2001). O que confirma a dificuldade de alcançar um diagnóstico precoce de meningite neonatal é a ausência de sinais específicos de envolvimento neurológico na fase aguda precoce do processo infeccioso. Febre, irritabilidade, convulsões e abaulamento da fontanela são mais frequentes em recém-nascidos com peso ≥ 2500 g, devido à maturidade do SNC. Enquanto distensão abdominal, apnéia, icterícia e anormalidades na contagem sanguínea são predominantes em recém-nascidos de baixo peso (KREBS & COSTA, 2007).

As manifestações clínicas e físicas em pacientes com meningite são consideravelmente variadas, incluindo rápido aparecimento de febre, vômito, dor de cabeça, fotofobia, rigidez de nuca, letargia, recusa alimentar, indisposição ou fraqueza. A gravidade dos sintomas pode ser influenciada pela idade, anormalidades anatômicas, doença concomitante, sistema imunológico e o patógeno causador (HONDA & WARREN, 2009).

1.4 Diagnóstico Laboratorial

Na suspeita clínica de quadro de meningite o profissional responsável pelo atendimento deve encaminhar o paciente para realização de exame confirmatório, sendo a análise do líquido cefalo-raquidiano (LCR) ou líquido o exame de referência para confirmação diagnóstica, avaliação da etiologia e escolha do antimicrobiano (GOLD, 1999; ROOS, 2000; KAPLAN, 2002).

Também devem ser coletados, inicialmente, exames de hemograma com leucograma, contagem de plaquetas, glicemia e hemocultura com antibiograma.

Segue tabela de diagnóstico diferencial de meningites de etiologia infecciosa.

Etiologia	Aspecto	Citometria	Citologia	Glicose	Proteínas	Cultura	Tinta da China
Normal	Claro	1 a 5	Linfo-monocitos	40 até 80mg/dl ou 2/3 da glicemia	10 a 40mg/dl	Negativa ou ausência de germes	-
Bacteriana aguda	Turvo ou purulento	>500	Polimorfo-nucleares	Diminuída	>40mg/dl	Positiva	-
Bacteriana parcialmente tratada	Ligeiramente turvo	<500	Predomínio de monócitos	Normal ou diminuída	Normal ou aumentada	Negativa	-
Viral	Claro	<500	Linfo-monocitos	Normal	Normal ou aumentada	Negativa	-
Fúngica	Claro	<500	Linfo-monocitos	Normal ou diminuída	>40mg/dl	Negativa	+
Tuberculosa	Ligeiramente turvo	<500	Linfo-monocitos	Diminuída	>40mg/dl	Positiva para BAAR	-

Tabela1. Diagnóstico Diferencial do Líquor nas Meningites. Manual de Meningite 2005.

Os valores descritos na tabela acima podem sofrer variações, conforme etiologia e fase da doença.

1.5 Tratamento

O tratamento da meningite bacteriana tem dois grandes objetivos: primeiro a rápida administração de um antimicrobiano com boa penetração no SNC para tratar a infecção neurológica, bem como com boa penetração tecidual para o tratamento de possíveis fontes fora do SNC e que tenha uma baixa toxicidade para o paciente. O segundo objetivo é o uso de um antiinflamatório para suprimir as sequelas da lise bacteriana (SOMAND & MEURER, 2009).

Durante muitos anos, a associação de ampicilina com aminoglicosídeo no período neonatal e ampicilina com cloranfenicol após os dois meses de idade foram os esquemas antimicrobianos de eleição para o tratamento empírico inicial das meningites bacterianas. Com o crescente aparecimento de cepas bacterianas resistentes aos esquemas convencionais, a antibioticoterapia para meningites tem sofrido alterações nos últimos anos. Dentre as novas opções terapêuticas, as cefalosporinas de 3ª geração, particularmente a ceftriaxona, já acumulam uma experiência bem sucedida de aproximadamente uma década no tratamento das meningites bacterianas em crianças (QUAGLIARELLO & SCHELD, 1997).

As cefalosporinas de 3ª geração esterilizam rapidamente o líquido cefalorraquidiano (LCR) e apresentam poucos efeitos adversos. Nas meningites em recém-nascidos dá-se preferência à cefotaxima pela maior experiência com o seu uso no período neonatal e pelo fato da mesma não ter excreção biliar, via pela qual a ceftriaxona é eliminada. A excreção biliar da ceftriaxona pode suprimir a flora bacteriana intestinal, como também deslocar a bilirrubina dos locais de ligação à albumina com conseqüente precipitação ou agravamento de quadros de icterícia neonatal. No período neonatal a antibioticoterapia é indicada por, pelo menos, 14 dias (KLEIN, 1994; SÁEZ-LLORENS & MCCRACKEN JUNIOR, 2003).

O tratamento alternativo com o antimicrobiano vancomicina pode ser utilizado quando a maioria das cepas resistentes às cefalosporinas permanecerem sensíveis à vancomicina (JOHN, 1994; TUNKEL *et al.*, 2004; RIBES *et al.*, 2005; CHAUDHURI *et al.*, 2008).

1.6 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae é uma bactéria pertencente à família *Streptococcaceae* (JEDRZEJAS, 2001), sendo caracterizado como diplococo Gram positivo (MARTNER *et al.*, 2008), frequentemente encontrado na comunidade em geral.

O pneumococo pode ser encontrado como comensal do trato respiratório superior nos humanos ou agir como agente patológico em várias enfermidades (MARTNER *et al.*, 2008), sendo causa principal de doenças como a pneumonia, meningite, otite média aguda e sinusite, acometendo todas as idades (GIL-SETAS *et al.*, 2004). É o segundo microorganismo mais comum como causa de meningite bacteriana em crianças menores de 2 anos de idade.

Atualmente existem mais de 90 sorotipos do *S. pneumoniae* conhecidos, sendo os mais prevalentes em ordem decrescente os tipos 14, 6B, 18C, 19F, 5, 9V, 23F e 6A (BRANDILEONE, *et al.*, 1995). Eles diferem entre si mediante as alterações estruturais e antigênicas da cápsula de polissacarídeo (KADIOGLU *et al.*, 2008) e estão distribuídos por faixa etária, sintomatologia clínica e região geográfica do paciente (SNIADACK *et al.*, 1995; KERTESZ *et al.*, 1998). Dentre os sorotipos, o mais invasor na faixa etária pediátrica é o tipo 14, enquanto em adultos e idosos, o sorotipo 3 é o que apresenta o mais alto potencial de virulência (HAUSDORFF *et al.*, 2005; HAUSDORFF, 2007).

Dentre os mecanismos de virulência estão a cápsula de polissacarídeo, a exotoxina pneumolisina, moléculas de superfície como as adesinas, a enzima hialuronidase, lipoproteínas e proteínas de superfície (MITCHELL & MITCHELL, 2010). O seu principal fator de virulência é a cápsula de polissacarídeo que leva a forte ativação das células de defesa (HARBOE *et al.*, 2009). Contudo, devido a sua capacidade de resistir à fagocitose, ela acaba colonizando o local com maior facilidade (NELSON *et al.*, 2007; KADIOGLU *et al.*, 2008; VAN DER POLL & OPAL, 2009; MITCHELL & MITCHELL, 2010).

A principal exotoxina do *S. pneumoniae* é a pneumolisina, uma proteína citoplasmática bacteriana multifuncional que possui propriedades citotóxicas e pró-inflamatórias. Os efeitos pró-inflamatórios da pneumolisina incluem ativação do complemento e dos neutrófilos, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), óxido nítrico

(BRAUN *et al.*, 2007) e ativação da resposta imune através do receptor Toll-like-4 (SRIVASTAVA *et al.*, 2005; BRAUN *et al.*, 2007). A toxina também possui efeitos sobre a produção de ERO e outros mediadores (MARRIOTT *et al.*, 2008), por pertencer à família das citolisinas colesterol dependente possui a capacidade de ligar-se ao colesterol da membrana das células e formar grandes poros, destruindo a integridade da membrana. Com isso, ocasiona morte neuronal através do dano na membrana mitocondrial (EL-RACHKIDY *et al.*, 2008) na região do giro denteado hipocampal e apoptose, como consequência disso, um exemplo, são os danos cocleares com perda posterior de audição (BRAUN *et al.*, 2007)

O pneumococo possui também as adesinas como componente e fator de infectividade. Dentre elas têm-se, por exemplo, a fosfatidilcolina que está implicada na aderência as células epiteliais (CUNDELL *et al.*, 1995; ROSENOW *et al.*, 1997). Outro constituinte é a enzima hialuronidase que pode romper o ácido hialurônico, presente nos tecidos dos mamíferos, o que facilita a propagação e a colonização do mesmo, muito comum na pneumonia (IRWIN *et al.*, 1994; MITCHELL & MITCHELL, 2010).

1.7 Fisiopatologia

A rota de infecção na meningite bacteriana é considerada uma cascata geral de eventos envolvendo a colonização do trato respiratório superior, a disseminação do patógeno no sangue, o cruzamento da barreira hematoencefálica (BHE) e a entrada do patógeno no espaço subaracnóide, com subsequente infecção e replicação bacteriana (FILIPPIDIS & FOUNTAS, 2009).

S. pneumoniae é um microrganismo encapsulado que possui características que o permitem invadir o hospedeiro pelo trato aéreo superior, onde proteínas especializadas conduzem a paralisia dos cílios celulares. O hospedeiro é incapaz de erradicar o microrganismo e este é capaz de invadir a mucosa e ir para a circulação sanguínea (SOMAND & MEURER, 2009).

O pneumococo, em humanos é uma das principais causas invasoras de infecções bacterianas, como meningite e bacteremia, também chamada de doença pneumocócica invasiva (DPI) (JANSEN *et al.*, 2009). É um patógeno capaz de

invadir o SNC e infectar as meninges, devido à incorporação de fatores de virulência. (FILIPPIDIS & FOUNTAS, 2009), sendo que a colonização assintomática ocorre em até 100% da população normal. A doença invasiva é sucedida pela colonização nasofaríngea (BROUWER *et al.*, 2009), seguida por bacteremia, penetração na BHE e invasão do SNC (MELI *et al.*, 2002). As infecções, como sinusite ou mastoidite, são outras vias de entrada da bactéria no SNC. Também, tem sido demonstrado em experimentos animais que *S. pneumoniae* pode entrar no SNC por uma via não-hematogênica, através da inoculação intranasal e otite média (MARRA & BRIGHAM, 2001; VAN GINKEL *et al.*, 2003).

A BHE é uma barreira estrutural e funcional do cérebro, formada por células endoteliais microvasculares, astrócitos e pericitos, responsáveis pela manutenção do microambiente neuronal através da regulação da passagem de moléculas para dentro e fora do cérebro, protegendo-o de microrganismos e toxinas presentes na corrente sanguínea e mantendo a homeostase do SNC (KIM, 2008; MAISEY *et al.*, 2008; WEISS *et al.*, 2009).

Este patógeno cruza a BHE pelo mecanismo transcelular, através da ligação, na parede celular, com a fosforilcolina e com o receptor do fator ativador de plaquetas (PAF) e atravessa sem evidência de dano ou detecção do microrganismo entre as células (KIM, 2008). O microrganismo pode então cruzar a BHE e proliferar-se no SNC, resultando em uma inflamação. Esta inflamação é responsável pela maioria dos sintomas da infecção do SNC, inclusive febre, meningite, e estado mental alterado, sendo que a inflamação também aumenta a permeabilidade da BHE, o que pode causar seu rompimento e comprometer ainda mais a integridade do SNC (KONTOS *et al.*, 1992; SOMAND & MEURER, 2009).

Uma vez alcançado o SNC, a bactéria multiplica-se rapidamente, disseminando-se sobre toda a superfície do cérebro, o que leva a uma rápida lise bacteriana com liberação de substâncias indutoras de inflamação como: o ácido teicóico e peptidoglicano (KOEDEL *et al.*, 2010). Os componentes bacterianos são reconhecidos pelo receptor Toll ou receptores que ativam o fator nuclear Kappa B (NF- κ B), levando à liberação de moléculas neuroinflamatórias e outras proteínas pró-inflamatórias do hospedeiro, como prostaglandinas, metaloproteinases, mieloperoxidase e ERO (VAN DE BEEK, 2009). A enzima mieloperoxidase inicia a peroxidação lipídica e ativa os leucócitos polimorfonucleares (MIRIC *et al.*, 2010).

Essas substâncias, ácido teicóico, peptidoglicano e componentes bacterianos, uma vez liberadas, estimulam as células cerebrais equivalentes aos macrófagos (astrócitos e células da microglia) e o endotélio capilar cerebral a produzirem citocinas, como TNF- α e IL-1 β considerados os mediadores que desencadeiam a resposta inflamatória meníngea. Ambos, TNF- α e IL-1 β , estimulam a adesão dos neutrófilos às células endoteliais e sua consequente passagem para o espaço subaracnóideo. Na aderência dos neutrófilos ao endotélio, participam um grupo de glicoproteínas, as denominadas moléculas de adesão, presentes tanto nos neutrófilos quanto no endotélio, que são ativadas pelo TNF- α e IL-1 β . Na evolução da resposta inflamatória, outros mediadores são em seguida liberados: outras interleucinas tais como IL-6, IL-8, PAF, metabólitos do ácido araquidônico e proteínas derivadas dos macrófagos (QUAGLIARELLO & SCHELD, 1992; TUNKELL & SCHELD, 1993).

Assim, ocorre a ativação de citocinas e quimiocinas, como a IL-6, IL-8, ativação de neutrófilos, peroxidação lipídica, quebras no DNA, danos mitocondriais e nitração da tirosina, devido o aumento na produção de ERO e, ou diminuição das defesas antioxidantes, provocada pelo estresse oxidativo (KLEIN *et al.*, 2006). Desta forma, pode ocasionar inibição da atividade dos complexos das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, inativação do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, inibição da atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase, inativação no canal de sódio da membrana e metabolismo energético celular diminuído (CUZZOCREA *et al.*, 2001). Culminando em danos cerebrais como edema cerebral, aumento de pressão intracraniana, hipoxemia por metabolismo anaeróbio, aumento de consumo de glicose (hipoglicorraquia), com aumento de lactose, além de problemas trombóticos e vasculite com a lesão neuronal e repercussões locais ou difusas, muitas vezes irreversível (DAVIS & GREENLEE, 2003; BRANDT, 2010).

A lesão microvascular através de dano oxidativo (SCHAPER *et al.*, 2002) e a alteração inflamatória dos vasos (vasculite) resultam na perda de auto-regulação vascular cerebral, vasoespasmo e trombose reversível ou permanente. A vasculatura cerebral de recém-nascidos é particularmente suscetível a vasculite (TAKEOKA & TAKAHASHI 2002). Muitas vezes resulta no desenvolvimento de necrose cortical, que leva à déficit sensório-motor, epilepsia e cegueira cortical (WEISFELT *et al.*, 2006), podendo ocorrer apoptose no giro denteado de células hipocâmpais que está associada à disfunção da memória e da aprendizagem em

sobreviventes de meningite (WELLMWER *et al.*, 2000; LEIB *et al.*, 2003). Efeitos tóxicos do patógeno (por exemplo, a pneumolisina de *S. pneumoniae*), e fatores do hospedeiro, incluindo mediadores inflamatórios e ERO aparecem responsáveis pelo desenvolvimento de lesões do ouvido interno (KLEIN *et al.*, 2008), ocorrendo deficiência auditiva (KASTEMBAUER & PFISTER 2003; VAN DE BEEK & DE GANS 2004) (Figura 1).

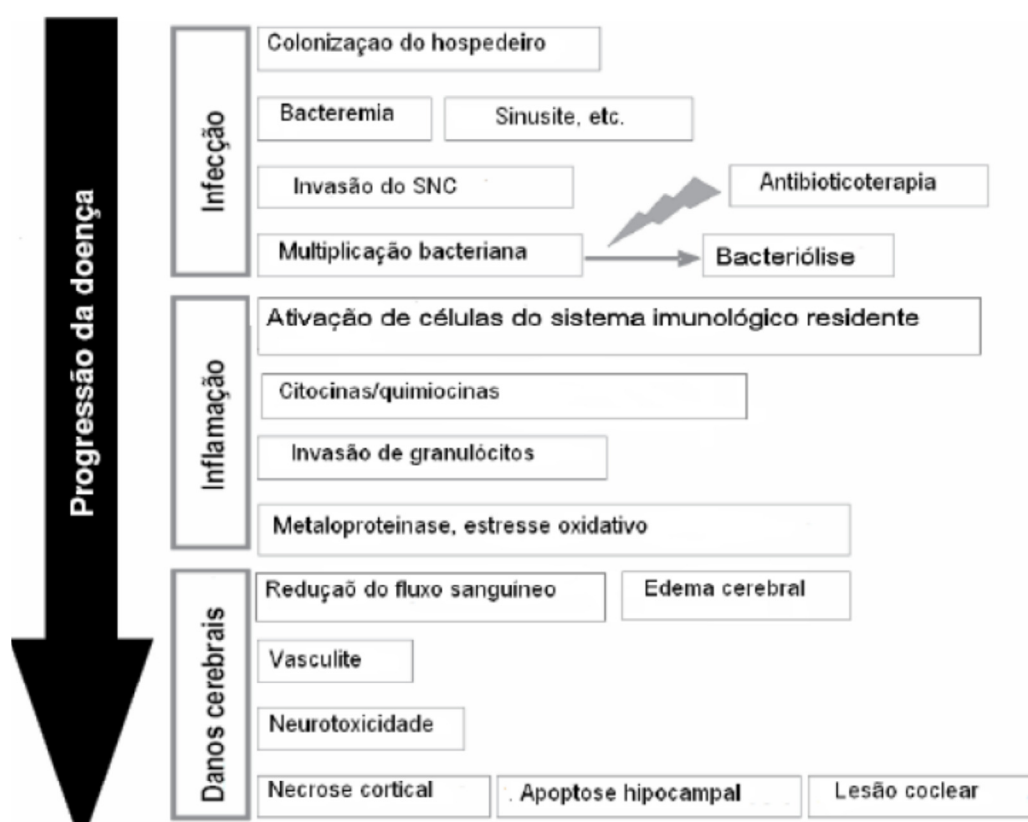


Figura 1. Fisiopatologia da Meningite Bacteriana. Adaptado de Grandgirard e Leib, 2010.

1.8 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)

Uma descoberta em 1953 ampliou o horizonte da neurobiologia para identificar e elucidar as funções celulares. Foi identificado a primeira neurotrofina, o Fator de Crescimento Neuronal (NGF) (LESSMANN *et al.*, 2003).

As neurotrofinas compõem uma família de proteínas com características estruturais semelhantes, pois, possuem um gene ancestral comum. Sua principal função é regular o desenvolvimento, manutenção e função dos neurônios do SNC e do sistema nervoso periférico (SNP), incluindo controle da função e plasticidade sináptica e modulação da sobrevivência neuronal (IBANEZ, 1998).

Após quase trinta anos da identificação do NGF, foi isolado em 1982, em neurônios de porcos, um homólogo do NGF, que foi chamado de Fator Neurotrófico derivado do Cérebro (BDNF). Em seguida foram identificados: Neurotrofina-3 (NT-3), Neurotrofina-4/5 (NT-4/5), Neurotrofina-6 (NT-6) e Neurotrofina-7(NT-7) (BARDE *et al.*, 1982; LESSMANN *et al.*, 2003).

Cada tipo de neurotrofina possui um receptor específico. Esses receptores específicos são da família da tirosina-quinase (TrK), que é composta por três receptores que podem ser ativados por uma ou mais neurotrofina (NGF, BDNF, NT-3, NT4/5). Os receptores TrkA, TrkB, ou TrkC são ativados respectivamente, pelo NGF, BDNF ou NT-4 e NT-3 (HUANG *et al.*, 2008), tendo papel fundamental em diferentes funções fisiológicas como formação de memória, plasticidade neuronal, controle da função sináptica (GRIESACH *et al.*, 2008). O BDNF é considerado a principal neurotrofina do cérebro, sendo produzido principalmente pelas células da glia e pelos núcleos neuronais. Ele é expresso em múltiplos tipos celulares, no hipocampo, neocortex, amígdala e cerebelo. Porém sua expressão maior é no SNC promovendo ações de sobrevivência principalmente em neurônios do hipocampo e córtex (GHOSH *et al.*, 1994; LINDHOLM *et al.*, 1996; SHIMIZU *et al.*, 2003; SAHA *et al.*, 2006).

No sangue periférico o BDNF pode ser avaliado no soro e no plasma através de venopunção. O BDNF atravessa a BHE e os seus níveis no soro e plasma têm alta correlação com BDNF no LCR, podendo fornecer informações importantes sobre alterações do BDNF no cérebro (PAN *et al.*, 1998; KARENIGE *et al.*, 2005).

Ele é sintetizado em uma pró-forma composta por 247 aminoácidos. O pró-BDNF é envolto em uma vesícula secretora, sendo liberado pelos neurônios, através de secreção constitutiva ou dependente de atividade de lançamento. Há duas formas de BDNF extracelular: pró-BDNF e BDNF "maduro". Depois de seu lançamento pelo neurônio, o pró-BDNF é proteoliticamente clivado por plasmina ou metaloproteinases, dando origem ao BDNF maduro (predominante e de maior relevância fisiológica no SNC de adultos). Ele liga-se a dois receptores de classes distintas: ao receptor TrkB e ao receptor p75, que é membro da família TNF. O BDNF "maduro" se liga com maior afinidade ao receptor TrkB, enquanto pró-BDNF liga-se com uma maior afinidade no receptor p75. Esta distinção da isoforma de ligação do BDNF é importante porque o TrkB predominantemente, suporta a sobrevivência neuronal e expressão de vários genes funcionais, (Figura 2) (NAGAHARA & TUSZYNSKI, 2011).

BDNF vem sendo pesquisado em diversas doenças neurodegenerativas e psiquiátricas. Desempenha papel fundamental na plasticidade neuronal e memória. Media os principais processos dependentes de estímulo externo, isto é, aprendizado, experiências e memórias (FREY *et al.*, 2006). É uma proteína responsável pelo processo de neurogênese (regeneração, proliferação, crescimento neural, aumento da resistência do cérebro ao dano), atua na plasticidade neural (capacidade que o SNC possui em modificar algumas das suas propriedades morfológicas e funcionais em resposta a alterações, tais como: influência do meio ambiente, estado emocional, nível cognitivo) e mediador das sinapses nervosas (HUANH *et al.*, 2008; SEN *et al.*, 2008)

O BDNF tem demonstrado reduzir o dano neuronal na meningite bacteriana e na isquemia cerebral em cortes de hipocampo de ratos induzidos a meningite e isquemia, através do bloqueio da ativação da caspase 3, associada com a apoptose neuronal (HAN *et al.*, 2000; BIFRARE *et al.*; 2005).

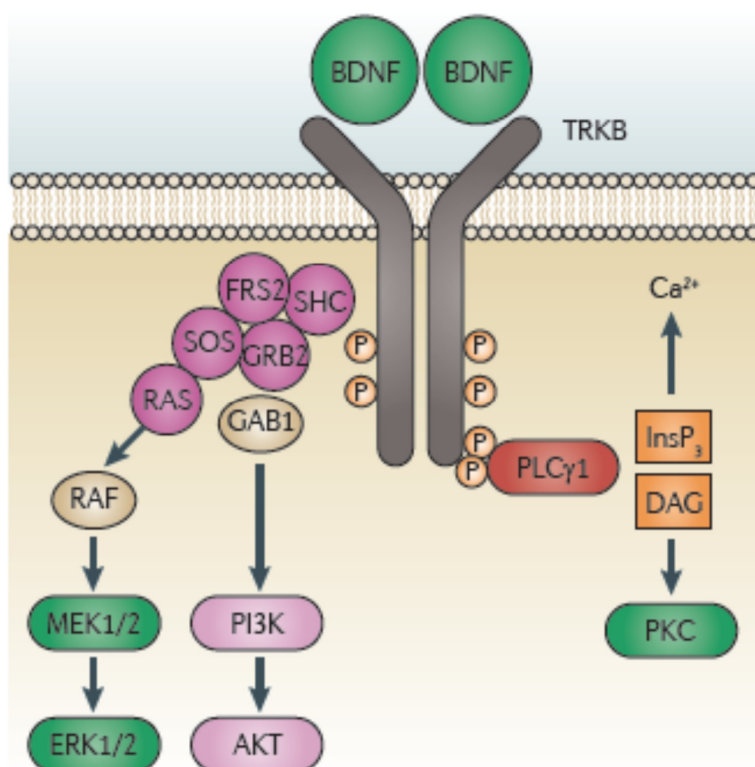


Figura 2: Mecanismo de ação do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro. Adaptado de Nagahara e Tuszynski, 2011.

1.9 Testes comportamentais

Os modelos animais são fundamentais para a pesquisa, porque mimetizam algumas características elementares de um estado patológico específico, favorecem sua compreensão e o desenvolvimento de terapias eficazes, fornecem uma aproximação simplificada aos complexos fatores relacionados à patologia, simplificam o sistema estudado, reduzindo o número de variáveis cujo controle é inacessível, oferecendo, assim, maior grau de controle experimental e permitindo manipulações experimentais que poderiam ser impossíveis em outras circunstâncias (THRANE *et al.*, 1996). A ciência tem buscado constantemente metodologias no âmbito comportamental que permitam estudar e avaliar a susceptibilidade, grau de ansiedade e de estresse. Para contemplar esta necessidade premente, vários modelos animais têm sido propostos, visando, sobretudo avaliar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e evolução das alterações indutoras de estresse (WILLNER, 1990).

O teste de Habituação ao Campo Aberto (Open-Field Task), objetiva analisar a “atividade exploratória” e é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas ao comportamento animal. Num sentido geral, refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não só respostas reflexas atencionais imediatas, como também as respostas voluntárias típicas.

A adoção desse tipo de teste apresenta uma clara conveniência pela facilidade de registro comportamental, quando comparado ao estudo no ambiente natural. O pressuposto básico envolvido em estudos de confinamento em um novo ambiente é que no intuito de explorar o ambiente, o animal precisa locomover-se nele. Dessa forma, a quantidade de movimento passa a ser um indicador de atividade exploratória. A resposta exploratória de levantar-se nas patas traseiras (*rearing*) é também muito comum em roedores e tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade uma vez que esse comportamento frequentemente se correlaciona com outras atividades como a auto-limpeza corporal (*grooming*) (Figura 3). No teste de habituação ao campo aberto são avaliadas a atividade motora, exploratória e memória de habituação do animal (VIANNA *et al.*, 2000).



Figura 3. Fotografia do aparato Habituação ao Campo aberto.

O teste de Esquiva Inibitória (Inhibitory Avoidance Task) consiste em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal (1mm de diâmetro). Os espaços entre as barras medem 1cm. Uma plataforma com 7cm de largura e 2,5cm de comprimento é colocada junto à parede esquerda do aparelho (Figura 4) (QUEVEDO *et al.*, 1999; ROESLER *et al.*, 2004). Na sessão de treino, os animais são colocados sobre a plataforma e mede-se o tempo que o animal leva para descer com as quatro patas da plataforma. Esse tempo é denominado latência. Imediatamente após descer da plataforma (com as 4 patas), o animal recebe um choque de 0,4 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal é novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele leva para descer (latência), porém não é administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Nesse teste é avaliada a memória aversiva do animal, ou seja, a memória a dor. (IZQUIERDO *et al.*, 1998; BEVILAQUA *et al.*, 2003).



Figura 4: Fotografia do aparato Esquiva Inibitória.

1.10 Considerações

A meningite bacteriana é considerada a infecção de maior severidade que ocorre no SNC, com taxas de mortalidade variando de 5 a 40% dos casos, além de sequelas permanentes que afetam um número maior que um terço dos sobreviventes, incluindo surdez, epilepsia, retardo mental e déficit sensório-motor, apesar dos avanços em antibioticoterapia e medicina intensiva. Os fatores associados com gravidade incluem agente infectante ou virulência, idade, localização geográfica e estado imune do paciente.

Outro fator importante associado com o prognóstico dos pacientes com meningite é a reação inflamatória associada, com risco de desenvolvimento de lesões e sequelas permanentes. O melhor entendimento dos eventos fisiopatológicos da resposta inflamatória do hospedeiro provocada pela bactéria e seus produtos, e dos mecanismos moleculares associados com a gênese do dano neuronal durante a meningite bacteriana e após o início de tratamento antibiótico podem promover melhorias no tratamento da doença.

O BDNF tem demonstrado efeito neuroprotetor nas múltiplas formas de danos neuronais induzidos pela meningite bacteriana. Além disso, os receptores de BDNF tropomiosina relacionados com receptores kinase tipo B (TRKB) são ativamente produzidos e transitam em múltiplas regiões do cérebro adulto (NAGAHARA *et al.*, 2011).

Estudo utilizando modelo animal em ratos demonstrou que o uso de BDNF exógeno previne lesões e reduz, significativamente, a perda neuronal associada com o dano inflamatório na meningite bacteriana (LI *et al.*, 2007).

O presente estudo, realizado em modelo animal, demonstrou que ratos que tiveram meningite induzida por pneumococos no período neonatal, mesmo recebendo tratamento antibiótico adequado, evoluíram com déficit cognitivo, de memória de habituação e memória aversiva, associados com redução dos níveis de BDNF no hipocampo.

Em conclusão, o BDNF demonstrou importância na prevenção do dano neuronal e sequelas no modelo animal, melhorando, dessa forma, o prognóstico da doença e podendo figurar, no futuro, como uma opção terapêutica na meningite bacteriana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a memória e os níveis de BDNF no hipocampo de ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica no período neonatal.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a memória de habituação em ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica no período neonatal;
- Avaliar a memória aversiva em ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica no período neonatal;
- Avaliar os níveis de BDNF no hipocampo de ratos Wistar adultos submetidos à meningite por *S. pneumoniae* durante o período neonatal.
- Correlacionar os níveis de BDNF com a memória e aprendizagem em ratos Wistar adultos submetidos à meningite por *S. pneumoniae* durante o período neonatal.

3 DISCUSSÃO

A meningite bacteriana é a infecção de maior gravidade que acomete o SNC (LI *et al.*, 2007). Apesar da evolução no tratamento com antimicrobianos, continua sendo uma doença devastadora, com mortalidade de até 30% (BIFRARE *et al.*, 2005). As sequelas a longo prazo da meningite bacteriana são comuns e incluem a perda auditiva, crises epiléticas, déficit sensório-motor, retardo mental e comprometimento do aprendizado e de memória (GRIMWOOD *et al.*, 1995; BEDFORD *et al.*, 2001; BIFRARE *et al.*, 2005).

Um estudo com crianças revelou que 12 anos após a recuperação da meningite bacteriana, deficiências neurológicas e intelectuais persistiram (GRIMWOOD *et al.*, 2000; BIFRARE *et al.*, 2005). A meningite pneumocócica está, particularmente, associada com uma elevada incidência de sequelas neurológicas (MERKELBACH *et al.*, 2000; VAN DE BEEK *et al.*, 2002; BIFRARE *et al.*, 2005), mortalidade e déficits neurológicos ainda ocorrem com frequência na meningite bacteriana em crianças, apesar do tratamento com antimicrobianos (LI *et al.*, 2007).

Conforme descrito anteriormente, os principais agentes que infectam os recém-nascidos são *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* e bacilos gram-negativos, sendo utilizado o modelo experimental com *S. pneumoniae* pela sua relação com níveis elevados de morbimortalidade e lesão celular documentada por outros autores no modelo experimental (BIFRARE *et al.*, 2003).

Estudos realizados na Inglaterra e País de Gales demonstraram que o *S. pneumoniae* é o quarto microorganismo ou agente infeccioso responsável pela meningite bacteriana no período neonatal, aproximadamente com o mesmo número de casos da *L. monocytogenes* (SYNNOTT *et al.*, 1994). Já, outro estudo realizado por um grupo de pesquisadores na Turquia, na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal de Hospital de referência, foram acompanhados os casos de meningite pneumocócica no Rn num período de 10 anos com uma incidência de 1% dos casos e índice de mortalidade de 50% (BAS, A.Y *et al.*, 2011). Artigo publicado após avaliação de infecções em Rns causadas por *S. pneumoniae* em unidade hospitalar da Tunísia demonstrou uma taxa de infecção de cerca de 1 a 2% dos casos com mortalidade em 50% dos casos e seqüelas neurológicas graves em 13% dos sobreviventes (BOUZIRI, 2011).

Nós demonstramos que ratos adultos sobreviventes à meningite no período neonatal, apresentaram alterações na memória de habituação e na memória aversiva, e esse déficit de memória foi correlacionado com a diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo. Durante o desenvolvimento do cérebro, os neurônios recém-formados derivados de células progenitoras localizadas na zona subgranular migram para a camada granular do giro dentado do hipocampo, onde se integram e se diferenciam em neurônios maduros. Qualquer alteração no período de desenvolvimento pode afetar a diferenciação e maturação dos neurônios do hipocampo, e a reação inflamatória maciça nas meninges e no espaço subaracnóide está associada com alterações no desenvolvimento neuronal do hipocampo (BRAUN & TUOMANEN, 1999).

Em humanos e em modelos animais experimentais, a meningite bacteriana causa lesão neuronal em regiões corticais e subcorticais (FREE *et al.*, 1996; ZYSK *et al.*, 1996). Três formas distintas de morte celular neuronal têm sido documentadas. No córtex, neurônios sofrem dano isquêmico, levando à necrose celular no núcleo isquêmico e morte celular na região perilesional pela caspase-3-dependente (GIANINAZZI *et al.*, 2003; BIFRARE *et al.*, 2005). Duas diferentes formas de morte celular foram identificadas no giro dentado do hipocampo, uma região importante para a aprendizagem e memória, a morte celular clássica ocorre pela ativação da caspase-3-dependente levando a apoptose que afeta principalmente a zona subgranular que contem neurônios imaturos; e a morte celular pela caspase-3-independente que causa a picnose, ocorrendo na camada de células denteadas granulares, afetando tanto neurônios maduros quanto imaturos (BIFRARE *et al.*, 2003; BIFRARE *et al.*, 2005).

Déficit mental e de aprendizagem são sequelas neurológicas de longa duração encontradas em sobreviventes de meningite pneumocócica. Na meningite pneumocócica experimental em ratos no período neonatal, a extensão da apoptose e da necrose nas seguintes áreas: córtex e hipocampo se correlacionaram com a extensão do déficit de aprendizagem (LEIB *et al.*, 2001; BELLAC *et al.*, 2007). Além disso, um modelo de camundongo infantil com dano cerebral após meningite pneumocócica mostrou a apoptose no giro dentado do hipocampo em 27% dos animais infectados (GRANDGIRARD *et al.*, 2007). No modelo de meningite em camundongos por pneumococos, a perda de neurônios, a diminuição de volume e a neurogênese no giro dentado hipocampal foram demonstrados após semanas a

partir da doença. Estes dados sugerem que o local da inflamação do SNC em si suprime a neurogênese adulta, afetando a proliferação neuronal e diferenciação. Em outro estudo, Hoffman e colaboradores, 2007, investigaram em especial a memória aversiva, e verificaram que havia comprometimento cognitivo em camundongos sobreviventes de meningite e esses dados foram correlacionados com alterações no hipocampo. Em outros modelos de meningite neonatal, utilizando *H. influenzae* tipo b, três dias depois da inoculação no cérebro anterior, níveis de norepinefrina e dopamina estavam significativamente elevados. No entanto, os sobreviventes de meningite mostraram prejuízo significativo nas tarefas de aprendizagem de esquila ativa e passiva e demonstraram um nível significativamente maior de atividade durante o período de habituação em gaiolas de atividade fotocelular circular (KONKOL *et al.*, 1987).

O BDNF e o seu receptor TrkB são encontrados em uma ampla variedade de tipos de células neuronais sendo altamente expressos no hipocampo. Devido aos seus efeitos neuroprotetores, o BDNF figura como uma promessa no tratamento de algumas doenças do SNC. Em vários estudos de lesão hipóxica-isquêmica, o BDNF exibiu grandes efeitos anti-apoptóticos pelo bloqueio da ativação da caspase-3. A meningite bacteriana por *S. pneumoniae*, principalmente, induz apoptose e, em menor grau picnose. Sendo fato que a extensão das várias formas de lesão depende do patógeno infectante (LEIB *et al.*, 1998; HAN *et al.*, 2000; HISATOMI *et al.*, 2001).

Um grande número de estudos tem abordado os mecanismos que levam à lesão cerebral na meningite. Uma vez que as bactérias passaram a ter acesso ao SNC, a sua multiplicação desencadeia uma resposta humoral e celular complexa do hospedeiro, constituída de mediadores imunes, tais como citocinas, EROs, metaloproteinases (LEIB & TAUBER, 1999), ocorrendo vasculite, vasoespasmo e obstrução das artérias e veias cerebrais, ruptura da BHE, e edema cerebral, bem como diminuição da auto-regulação cerebral, levando à danos hipóxico-isquêmicos graves (LEIB & TAUBER, 1999; NAU & BRUCK, 2002). EROs são produzidas por bactérias que causam danos em células gliais por oxidação de lipídios de membrana e DNA levando à perda de integridade da membrana e depleção de energia, respectivamente (KOEDERL & PFISTER, 1999). A liberação excessiva de aminoácidos excitatórios causa despolarização da membrana, influxo de Ca^{2+} e insuficiência na produção de energia para a célula, levando à morte celular. Além disso, as caspases ativadas por estímulos diversos, tais como a ação de espécies

reativas intermediárias de oxigênio e excitotoxicidade convergem para a matriz mitocondrial e induzem a apoptose neuronal (ATLANTE *et al.*, 2000; FISKUM, 2000; LIU *et al.*, 2001). As substâncias tóxicas e as proteases produzidas por bactérias podem causar danos aos neurônios diretamente. Por exemplo, a hemolisina e a pneumolisina liberadas pelas bactérias são capazes de causar danos aos neurônios, provavelmente, promovendo o influxo de Ca^{2+} extracelular (NAU & BRUCK, 2002).

Muitos estudos têm demonstrado que o BDNF endógeno e exógeno pode neutralizar a morte de células após insulto cerebral isquêmico. Quando a atividade de BDNF endógena ou a mutação do gene BDNF é bloqueada, o tamanho do infarto aumenta, diminuindo a população de neurônios e sua sobrevivência com prejuízo importante na função de memória (LARSOON *et al.*, 1999; LI & SHUI, 2001). Estudos demonstram que a administração de BDNF exógeno pode reduzir o tamanho do infarto, aumentar a população sobrevivente dos neurônios, suprimir a apoptose e reduzir ou evitar a perda ou déficit de memória (KIPRIANOVA *et al.*, 1999; YAMADA *et al.*, 2002). No tratamento de BDNF antes da isquemia, os efeitos neuroprotetores são maiores do que no tratamento após a isquemia (CHENG *et al.*; 1997). Não está claro como BDNF protege os neurônios das lesões inflamatórias na meningite bacteriana, mas vários mecanismos possíveis têm sido propostos. Primeiro, o BDNF poderia envolver a modulação da homeostase do cálcio neuronal através da regulação da expressão de ligação de cálcio e proteínas, resultando em uma maior resistência contra a morte neuronal (FIUMELI *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2007). Uma outra explicação possível para o efeito benéfico do BDNF na meningite experimental pode estar relacionada com sua capacidade de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes e, assim, atenuar os efeitos nocivos das EROs. No hipocampo, a meningite bacteriana provoca apoptose, via caspase-3- dependente, em neurônios, incluindo neurônios imaturos localizados na zona subgranular do giro denteado (GIANINAZZI *et al.*, 2003; BIFRARE *et al.*, 2005). Em um modelo de hipóxico-isquêmico neonatal, o BDNF tem se mostrado protetor contra a morte celular bloqueando a ativação da caspase-3 pelo receptor TrkB (HAN & HOLTZMAN, 2000). A atividade inibitória de BDNF via caspase-3 é mediada pelos caminhos pró-apoptóticos e é, provavelmente, responsável pelo seu efeito benéfico sobre a morte celular dependente de caspase-3 no presente estudo.

O BDNF é uma proteína que juntamente com seus receptores, é expressa amplamente no SNC e desempenha um papel crítico na organização de redes

neuronal e neuroplasticidade sináptica, especialmente no hipocampo. Sendo encontrada em uma variedade de modelos animais e, aparentemente, em seres humanos (IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Ele também controla a morte celular neuronal no desenvolvimento e é crucial na diferenciação e sobrevivência neuronal (HUANG & REICHARDT, 2001). Conforme dados de trabalhos publicados, foi demonstrado uma diminuição da expressão de mRNA BDNF e sua produção no cérebro, assim como de seu receptor TrkB, após a administração de antimicrobianos na meningite bacteriana, com conseqüente redução no papel de neuroproteção do BDNF (LI *et al.*, 2003; TAUBER *et al.*, 2005). No entanto, este efeito não foi observado em animais não infectados tratados com antimicrobianos (LI *et al.*, 2003).

Mais recentemente, LI *et al.* (2007) confirmaram que neurônios foram danificados após a meningite bacteriana, e que o BDNF exógeno teve ação protetora em um grande número de neurônios no córtex e no hipocampo durante a reação inflamatória cerebral da meningite bacteriana. Esses autores sugerem que a administração exógena de BDNF pode ser uma maneira nova e eficaz para reduzir sequelas após a meningite bacteriana, diminuindo assim a mortalidade neuronal.

4 CONCLUSÃO

O avanço na terapêutica com agentes antimicrobianos teve um efeito profundo sobre o curso clínico e o prognóstico da meningite bacteriana, além de uma melhora discreta no prognóstico com o advento da medicina e cuidados intensivos. No entanto, essas melhorias discretas no tratamento associadas com índices elevados de sequelas podem resultar de uma melhor compreensão dos eventos fisiopatológicos que ocorrem após a ativação da resposta inflamatória do hospedeiro tanto por bactérias ou seus produtos, e do mecanismo molecular que participam na gênese da lesão cerebral durante a meningite bacteriana e após o início do tratamento com antimicrobiano.

No nosso estudo, nós verificamos que os animais induzidos à meningite no período neonatal apresentaram prejuízos na memória aversiva e memória de habituação na vida adulta. Estes danos cognitivos foram correlacionados com a

diminuição do BDNF no hipocampo, que é uma área crucial para o desenvolvimento da memória.

Desta forma este modelo animal de meningite é importante para estudar as sequelas cognitivas e comportamentais a longo prazo ocasionadas pela meningite no período neonatal. Novos estudos são necessários para compreender melhor a fisiopatologia desta complexa doença e, além disso, verificar o efeito protetor do BDNF como uma nova terapia coadjuvante no tratamento da meningite pneumocócica.

REFERÊNCIAS

ATLANTE, A. et al. Cytochrome *c* is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. **J Biol Chem**, n. 275, p. 37159-37166, 2000.

BARDE, Y.A.; EDGAR, D.; THOENEN, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **EMBO**, n. 1, p. 549-553, 1982.

BAS, A.Y; DEMIREL, N; AYDIN, M; ZENCIROGLU, A; TONBUL, A; TANIR, G. Pneumococcal meningitis in the newborn period in a prevaccination era: a 10-year experience at a tertiary intensive care unit. **The Turkish Journal of Pediatrics**, n. 53, p. 142-148, 2011.

BEDFORD, H. et al. Meningitis in infancy in England and Wales: follow up at age 5 years. **BMJ**, n. 323, p. 533-536, 2001.

BELLAC, C. et al. Gene and protein expression of galectin-3 and galectin-9 in experimental pneumococcal meningitis. **Neurobiol Dis**, n. 28, p. 175-183, 2007.

BEVILAQUA, L.R. et al. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. **Eur J Neurosci**, n. 17, p. 897-902, 2003.

BIFRARE, Y.D. et al. Bacterial meningitis causes two distinct forms of cellular damage in the hippocampal dentate gyrus in infant rats. **Hippocampus**, n. 13, p. 481-488, 2003.

BIFRARE, Y.D. et al. Brain-derived neurotrophic factor protects against multiple forms of brain injury in bacterial meningitis. **J Infect Dis**, n. 191, p. 40-45, 2005.

BOUZIRI, A; HADI, S.B; KHALDI, A; BORGHI, A; MENIF, K; JABALLAH, N.B. Early neonatal infection caused by *Streptococcus pneumoniae*: report of 3 cases. **La Tunisie Medicale**, v. 89, n. 2, p. 206-209, 2011.

BRANDILEONE, M.C. et al. Distribution of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive infections over a 16-year period in the greater Sao Paulo area, Brazil. **JCM**, n. 33, p. 2789-2791, 1995.

BRANDT, C.T. Experimental studies of pneumococcal meningitis. **Dan Med Bull**, n. 57, 2010.

BRAUN, J.S.; TUOMANEN, E.I. Molecular mechanisms of brain damage in bacterial meningitis. **Adv Pediatr Infect Dis**, n. 14, p. 49-71, 1999.

BRAUN, J.S. et al. Pneumolysin Causes Neuronal Cell Death through Mitochondrial Damage. **Infection and Immunity**, n. 75, p. 4245-4254, 2007.

BROUWER, M.C. et al. Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, n. 9, p. 31-44, 2009.

BROUWER, M.C.; TUNKEL, A.R.; VAN DE BEEK, D. Epidemiology, Diagnosis, and Antimicrobial Treatment of Acute Bacterial Meningitis. **Clin Microbiol Rev**, n. 23, p. 467-492, 2010.

CAMPAGNE, G. et al. Epidemiology of bacterial meningitis in Niamey, Niger, 1981-96. **Bull World Health Organ**, n. 77, p. 499-508, 1999.

CARVALHO, C.A.R. Manual de Meningite, 2005. Disponível em: <http://www.fmt.am.gov.br/manual/meningite.htm>.

CHAUDHURI, A. et al. EFNS guideline on the management of community-acquired bacterial meningitis: Report of an EFNS Task Force on acute bacterial meningitis in older children and adults. **Eur J Neurol**, n. 15, p. 649-659, 2008.

CHENG, Y. et al. Marked age-dependent neuroprotection by brain derived neurotrophic factor against neonatal hypoxic ischemic brain injury. **Ann Neurol**, n. 41, p. 521-529, 1997.

CHOIC, C. Bacterial meningitis in aging adults. **Clin Infect Dis**, n. 33, p. 1380-1385, 2001.

CUNDELL, D.R. et al. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. **Nature**, n. 377, p. 435-438, 1995.

CUZZOCREA, S. et al. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharm Rev**, n. 53, p. 135-159, 2001.

DAOUD, A.S. et al. Bacterial meningitis: Still a cause of high mortality and severe neurological morbidity in childhood. **J Trop Pediatr**, n. 41, p. 308-310, 1995.

DAVENPORT, M.C. et al. Bacterial meningitis: risk factors for development of acute complications. **Records Pediatrics**, n. 105, p. 405-410, 2007.

DAVIS, L.E.; GREENLEE, J.E. Pneumococcal meningitis: Antibiotics essential but insufficient. **Brain**, n. 126, p. 1013-1014, 2003.

DE GANS, J.; VAN DE BEEK, D. Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. **N Engl J Med**, n. 347, p. 1549-1556, 2002.

EL-RACHKIDY, R.G.; DAVIES, N.W.; ANDREW, P.W. Pneumolysin generates multiple conductance pores in the membrane of nucleated cells. **Biochem Biophys Res Com**, n. 368, p. 786-792, 2008.

FILIPPIDIS, A.; FOUNTAS, K.N. Nasal lymphatics as a novel invasion and dissemination route of bacterial meningitis. **Med Hypotheses**, n. 72, p. 694-697, 2009.

FISKUM, G. Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. **J Neurotrauma**, n. 17, p. 843-55, 2000.

FIUMELLI, H. et al. Opposite regulation of calbindin and calretinin expression by brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons. **J Neurochem**, n. 74, p. 1870-1877, 2000.

FREE, S.L. et al. Bilateral hippocampal volume loss in patients with a history of encephalitis or meningitis. **Epilepsia**, n. 37, p. 400-405, 1996.

FREY, B.N. et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. **Life Sci**, n. 79, p. 281-286, 2006.

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

- GIL-SETAS, A. et al. Antibiotic sensitivity and treatment recommendations for *Streptococcus pneumoniae*. **Anales Sistema Sanitario Navarra**, n. 27, p. 37-43, 2004.
- GOETGHEBUER, T. et al. Outcome of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b in children in The Gambia. **Trop Med Int Health**, n. 5, p. 207-213, 2000.
- GHOSH, A.; CARNAHAN, J.; GREENBERG, M.E. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. **Science**, n. 263, p. 1618–1623, 1994.
- GOLD, R. Epidemiology of Bacterial Meningitis. **Infect Diseases Clin North Am**, v. 13, n. 3, p. 515-525, 1999.
- GRANDGIRARD, D.; LEIB, S.L. Strategies to prevent neuronal damage in pediatric bacterial meningitis. **Curr Opin Pediatr**, n. 18, p. 112-118, 2006.
- GRANDGIRARD, D. et al. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. **Acta Neuropathol**, n. 114, p. 609–617, 2007.
- GRIESBACH, G.S. et al. Voluntary exercise or amphetamine treatment, but not the combination, increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor and synapsin I following cortical contusion injury in rats. **J Neurosci**, n. 154, p. 530-40, 2008.
- GRIMWOOD, K. et al. Adverse outcomes of bacterial meningitis in schoolage survivors. **Pediatrics**, n. 95, p. 646-656, 1995.
- GRIMWOOD, K. et al. Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. **ADC**, n. 83, p. 111-6, 2000.
- HAN, B.H., HOLTZMAN, D.M. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. **J Neurosci**, n. 20, p. 5775–5781, 2000.
- HAN, B.H. et al. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. **Neurobiol Dis**, n. 7, p. 38-53, 2000.
- HARBOE, Z.B. et al. Pneumococcal Serotypes and Mortality following Invasive Pneumococcal Disease: A Population-Based Cohort Study. **Plos Med**, n. 26, p. 6, 2009.

HAUSDORFF, W.P.; FEIKIN, D.R.; KLUGMAN, K.P. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. **Lancet Infect Dis**, n. 5, p. 83-93, 2005.

HAUSDORFF, W.P. The roles of pneumococcal serotypes 1 and 5 in paediatric invasive disease. **Vaccine**, n. 25, p. 2406-2412, 2007.

HAUSSEN, D.C. et al. Neonatal meningitis: related features, **Arch Neuropsychiat**, n. 63, p. 625-631, 2005.

HISATOMI, T. et al. Relocalization of apoptosis inducing factor in photoreceptor apoptosis induced by retinal detachment in vivo. **Am J Pathol**, n. 158, p. 1271-1278, 2001.

HOFFMANN, O. et al. Pneumococcal cell wall-induced meningitis impairs adult hippocampal neurogenesis. **Infect Immun**, n. 75, p. 4289-4297, 2007.

HONDA, H.; WARREN, D.K. Central Nervous System Infections: Meningitis and Brain Abscess. **Infect Dis Clin North Am**, n. 23, p. 609-623, 2009.

HOOGMAN, M. et al. Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis. **JNNP**, n. 78, p. 1092-1096, 2007.

HUANG, E.J.; REICHARDT, L.F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci**, n. 24, p. 677-736, 2001.

HUANG, T.L.; LEE, C.T.; LIU, Y.L. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in patients with major depression: Effects of antidepressants. **J Psychiatr Res**, n. 42, p. 521-525, 2008.

IBANEZ, C.F. Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. **Trends Neurosci**, n. 21, p. 438-444, 1998.

IRAZUZTA, J.E. et al. Serum cleaved Tau protein and neurobehavioral battery of tests as markers of brain injury in experimental bacterial meningitis. **Brain Res**, n. 913, p. 95-105, 2001.

IRAZUZTA, J. E. et al. Dexamethasone decreases neurological sequelae and caspase activity. **Intensive Care Med**, n. 31, p.146-150, 2005.

IRWIN, C.R.; SCHOR, S.L.; FERGUSON, M.W. Effects of cytokines on gingival fibroblasts in vitro are modulated by the extracellular matrix. **J Periodontal Res**, n. 29, p. 309-317, 1994.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, n. 68, p. 285–316, 1997.

IZQUIERDO, I. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, n. 393, p. 635-636, 1998.

JANSEN, A.G.S. et al. Invasive Pneumococcal Disease among Adults: Associations among Serotypes, Disease Characteristics, and Outcome. **Clin Infect Dis**, n. 49, p. 23-29, 2009.

JEDRZEJAS, M.J. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. **Microbiol Mol Biol Review**, n. 65, p.187-207, 2001.

JOHN, C.C. Treatment failure with use of a third-generation cephalosporin for penicillin-resistant pneumococcal meningitis: Case report and review. **Clin Infect Dis**, n. 18, p.188-193, 1994.

KADIOGLU, A. et al. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat Rev Microbiol**, n. 6, p. 288-301, 2008.

KAPLAN, S.L. Management of pneumococcal meningitis. **Pediatr Infect Dis J**, v. 21, n. 6, p. 589-591, 2002.

KAREGE, F. et al. Low Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels in Serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. **Biol Psychiatry**, n. 57, p. 1062-1078, 2005.

KASTENBAUER, S.; PFISTER, H.W. Pneumococcal meningitis in adults: Spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. **Brain**, n. 126, p. 1015-1025, 2003.

KERTESZ, D.A. et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan American Health Organization Surveillance Study. **Clin Infect Dis**, n. 26, p. 1355-1361, 1998.

KIM, K.S. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. **Nat Rev Microbiol**, n. 6, p. 625-634, 2008.

KIM, K.S. Acute bacterial meningitis in infants and children. **Lancet Infect Dis**, n.10, p. 32-42, 2010.

KOEDEL, U.; PFISTER, H.W. Oxidative stress in bacterial meningitis. **Brain Pathology**, n. 9, p. 57-67, 1999.

KOEDEL, U.; KLEIN, M.; PFISTER, H.W. New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. **Current Opinion Infectious Diseases**, n. 23, p. 217-223, 2010.

KONKOL, R.J.; Hemophilus influenzae meningitis in the rat:behavioral, electrophysiological, and biochemical consequences. **Ann Neurol**, n. 21, p. 353-360, 1987.

KONTOS, C.D. et al. Cytochemical detection of superoxide in cerebral inflammation and ischemia in vivo. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, n. 263, p. 1234-1242, 1992.

KLEIN, J.O. Antimicrobial treatment and prevention of meningitis. **Pediatr Ann**, n. 23, p. 76-81, 1994.

KLEIN, M.; KOEDEL, U.; PFISTER, H.W. Oxidative stress in pneumococcal meningitis: A future target for adjunctive therapy? **Prog Neurobiol**, n. 80, p. 269-280, 2006.

KLEIN, M. et al. Nitrogen and oxygen molecules in meningitis-associated labyrinthitis and hearing impairment. **Infection**, n. 36, p. 2-14, 2008.

KREBS, V.L.J.; COSTA, G.A.M. Clinical outcome of neonatal bacterial meningitis according to birth weight. **Archives of Neuropsychiatry**, n. 65, p. 1149-1153, 2007.

KIPRIANOVA, I. et al. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death and glial activation after global ischemia in the rat. **JNR**, n. 56, p. 21-27, 1999.

LARSSON E, et al. Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats. **J Cereb Blood Flow Metab**, n. 19, p. 1220-1228, 1999.

LEIB, S.L; et al. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. **J Clin Invest**, n. 98, p. 2632-2639, 1996.

LEIB, S.L; et al. Inducible nitric oxide synthase and the effect of aminoguanidine in experimental neonatal meningitis. **J Infect Dis**, n.177, p.692-700, 1998.

LEIB S.L; TAUBER M.G. Pathogenesis of bacterial meningitis. **Infec Dis Clin North Am**, n.13, p.527-548, 1999.

LEIB S.L; et al. Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. **Brain**, n.124, p.1734-1742. 2001.

LEIB S.L, et al. Dexamethasone aggravates hippocampal apoptosis and learning deficiency in pneumococcal meningitis in infant rats. **Pediatr Res**, n.54; p. 353-357, 2003.

LESSMANN V; GOTTMANN K; MALCANGIO M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. **Progr Neurobiol**, n.69, p. 341-374, 2003.

LI L; SHUI Q.X. Brain derived neurotrophic factor and ischemia- hypoxia brain injure. **Section of Pediatrics of Foreign Medical Sciences**, n. 28, p. 155 -158, 2001.

LI L; SHUI Q.X; ZHAO Z.Y. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression following antibiotic treatment of experimental bacterial meningitis. **J Child Neurol**, n.18, p. 828-834, 2003.

LI L, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Rescues Neurons From Bacterial Meningitis. **Pediatr Neurol**, n.36, p. 324-329, 2007.

LIBERALESSO, et al. Incidence and risk factors for seizures in central nervous system infections in childhood. **J Epilepsy Clin. Neurophysiol**, n.15, p. 83-88, 2009.

LINDHOLM D, et al. Autocrine- paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-1 and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4. **Eur J Neurosci**, n.8, p.1452-1460, 1996.

LIU B, et al. Molecular consequences of activated microglia in the brain: over activation induces apoptosis. **J Neurochem**, n.77, p. 182-189, 2001.

MAISEY H.C; DORAN K.S; NIZET V. Recent advances in understanding the molecular basis of group B Streptococcus virulence. **Expert Rev Mol Med**, n.10, p. 1-16, 2008.

MARRA A; BRIGHAM D. *Streptococcus pneumoniae* causes experimental meningitis following intranasal and otitis media infections via a nonhematogenous route. **Infect Immun**, n.69, p.7318-7325, 2001.

MARRIOTT H.M; MITCHELL T.J; DOCKRELL D.H. Pneumolysin: A double-edged sword during the host-pathogen interaction. **Curr Mol Med**, n.8, p. 497-509, 2008.

MARTNER A, et al. Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. **Infect and Immun**, n.76, p. 4079-4087, 2008.

MELI D.N, et al. Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. **Curr Opin Infect Dis**, n.15, p. 253-257, 2002.

MERKELBACH S, et al. Cognitive outcome after bacterial meningitis. **Acta Neurol Scand**, n.102, p. 118-123, 2000.

MIRIC D, et al. Oxidative stress and myeloperoxidase activity during bacterial meningitis: Effects of febrile episodes and the BBB permeability. **Clin Biochem**, n.43, p. 246-252, 2010.

MITCHELL A.M.; MITCHELL T.J. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors and variation. **Clin Microbiol Infect**, n.16, p. 411-418, 2010.

MOLYNEUX EM, et al. Dexamethasone treatment in childhood bacterial meningitis in Malawi: A randomised controlled trial. **Lancet**, n.360, p. 211-218, 2002.

NAGAHARA A,H, TUSZYNSKI M,H. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, n.10, p. 209-219, 2011.

NAU R; SOTO A.; BRUCK W. Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. **J Neuropathol Exp Neurol**, n.58, p. 265-274, 1999.

NAU R; BRUCK W. Neuronal injury in bacterial meningitis: Mechanisms and implications for therapy. **Trends Neurosci**, n.25, p. 38-45, 2002.

NELSON A.L, et al. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. **Infect Immune**, n.75, p. 83-90, 2007.

O'BRIEN K.L, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, n. 374, p. 893-902, 2009.

PAN W, et al. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. **Neuropharmacology**, n.37, p. 1553-1561, 1998.

PELTOLA H. Worldwide *Haemophilus influenzae type b* disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. **Clin Microbiol Rev**, n.13, p. 302-17, 2000.

PFISTER H.W; KOEDEL U; PAUL R. Acute meningitis. **Cur Infect Dis Rep**, n.1, p. 153-159, 1999.

QUAGLIARELLO V.J; SCHELD W.M. Bacterial meningitis: Pathogenesis, pathophysiology, and progress. **N Engl J Med**, n.327, p. 864-872, 1992.

QUAGLIARELLO V.J; SCHELD W.M. Treatment of bacterial meningitis. **N Engl J Med**, n.336, p.708-716, 1997.

QUEVEDO J, et al. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. **Learn Mem**, n.6, p. 600-607, 1999.

RIBES S, et al. Evaluation of ceftriaxone, vancomycin and rifampicin alone and combined in an experimental model of meningitis caused by highly cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* ATCC 51916. **J Antimicrob Chemother**, n.56, p. 979-982, 2005.

ROESLER R, et al. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. **Eur J Neurosci**, n.19, p. 1041-1045, 2004.

ROOS, K.L. Acute Bacterial Meningitis. **Semin Neurol**, v. 20, n. 3, p. 293-306, 2000.

ROSENOW C, et al.. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. **Mol Microbiol**, n.25, p. 819-829, 1997.

ROSSONI AMO, et al. Acute Bacterial Meningitis Caused By Streptococcus Pneumoniae Resistant To The Antimicrobial Agents And Their Serotypes. **Arq Neuropsiquiatr**, n.66, p.509-515, 2008.

SÁEZ-LLORENS X; MCCRACKEN JR G.H. Bacterial meningitis in children. **Lancet**, n.361, p.2139-2148, 2003.

SAHA R.N, LIU X, PAHAN K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF- α : a case for the neuroprotective role of cytokine. **J Neuroimmune Pharmacol**, n.1, p.212-222, 2006.

SCHAPER M, et al. Cerebral vasculature is the major target of oxidative protein alterations in bacterial meningitis. **J Neuropathol Exp Neurol**, n.61, p. 605-613, 2002.

SEN S; DUMAN R; SANACORA G. Serum BDNF, Depression and Anti-Depressant Medications: Meta-Analyses and Implications. **Biol Psychiatry**, n.64, p. 527-532, 2008.

SHIMIZU E, et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. **Biol Psychiatry**, n.54, p. 70-75, 2003.

SOMAND D; MEURER W. Central Nervous System Infections. **Emerg Med Clin**, n.27, p. 89-100, 2009.

SNIADACK D.H, et al. Potential Interventions for the prevention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children – implications for vaccine strategies. **J Pediatric Infect Dis**, n.14, p. 503-510, 1995.

SRIVASTAVA, A, et al. The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. **Infect Immun**, n.73, p. 6479-6487, 2005.

SYNNOTT, M.B; MORSE, D.L; HALL, S.M. Neonatal Meningitis in England and Wales: a review of routine national data. **Arch Dis Child**, n. 71, p. 75-80, 1994.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, 2011. Disponível em:http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=37811. Acesso em: 31 Ago. 2011.

TAKEOKA M; TAKAHASHI T. Infectious and inflammatory disorders of the circulatory system and stroke in childhood. **Cur Opin Neurol**, n.15, p. 159-164, 2002.

TAUBER SC, et al. Increased expression of BDNF and proliferation of dentate granule cells after bacterial meningitis. **J Neuropathol Exp Neurol**, n.64, p. 806-815, 2005.

THOMAS K.E, et al. The diagnostic accuracy of Kernig's sign, Brudzinski's sign, and nuchal rigidity in adults with suspected meningitis. **Clin Infect Dis**, n.35, p. 46-52, 2002.

THRANE P.S, et al. Retrograde axonal cytokine transport; a pathway for immunostimulation in the brain inducing hypoxia and sudden infant death. **Med Hypotheses**, n.44, p. 81-84, 1996.

TUOMANEN E. Modulation of inflammation in bacterial meningitis. **Isr J Med Sci**, n.30, p.339-341, 1994.

TUNKELL A.R; SCHELD W.M. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. **Clin Microbiol Rev**, n. 6, p. 118-136, 1993.

TUNKEL A.R, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. **Clin Infect Dis**, n.39, p. 1267-1284, 2004.

VAN DE BEEK D, et al. Cognitive impairment in adults with good recovery after bacterial meningitis. **J Infect Dis**, n.186, p. 1047-1052, 2002.

VAN DE BEEK D; DE GANS J. Meningitis-associated hearing loss: protection by adjunctive antioxidant therapy. **Ann Neurol**, n.55, p.597-598, 2004.

VAN DE BEEK D, et al. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. **N Engl J Med**, n.351, p. 1849-1859, 2004.

VAN DE BEEK D, et al. Community acquired bacterial meningitis in adults. **N Engl J Med**, n.354, p. 44-53, 2006.

VAN DE BEEK D. Corticosteroids for acute adult bacterial meningitis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, n.39, p.531-538, 2009.

VAN DER POLL T; OPAL S.M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. **Lancet**, n.374, p. 1543-1556, 2009.

VAN GINKEL FW, et al. Pneumococcal carriage results in ganglioside-mediated olfactory tissue infection. **Proc Natl Acad Sci USA**, n.100, p.14363-14367, 2003.

VIANNA M.R, et al. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. **Learn Mem**, n.7, p.333-340. 2000.

WATT J.P, et al. Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae type b* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, n.374, p. 903–911. 2009.

WEISFELT M, et al. Pneumococcal meningitis in adults: new approaches to management and prevention. **Lancet Neurol**, n.5, p. 332-342. 2006.

WEISS N, et al. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochim Biophys Acta**, n.1788, p. 842-857. 2009.

WELLMER A, et al. Spatial memory and learning deficits after experimental pneumococcal meningitis in mice. **Neurosci Lett**, n.296, p. 137-140, 2000.

WENGER J,D, et al. Bacterial meningitis in the United States, 1986: report of a multistate surveillance study. The Bacterial Meningitis Study Group. **J Infect Dis**, n.162, p.1316-1323, 1990.

WILLNER P. Animal models of depression: an overview. **Pharmacol Therapeutics**, n. 45, p. 425-455, 1990.

YAMADA K; MIZUNO M; NABESHIMA T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. **Life Sci**, n.70, p. 735-744, 2002.

ZYSK G, et al. Antiinflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. **J Neuropathol Exp Neurol**, n. 55, p. 722-728, 1996.