

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

CURSO DE FARMÁCIA

LIEGE DA ROSA FANTIN

**O USO DIÁRIO DO AMBIENTE ENRIQUECIDO PREVINE O DANO COGNITIVO
EM RATOS WISTAR ADULTOS INDUZIDOS A MENINGITE PNEUMOCÓCICA NO
PERÍODO INFANTIL**

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2012

LIEGE DA ROSA FANTIN

**O USO DIÁRIO DO AMBIENTE ENRIQUECIDO PREVINE O DANO COGNITIVO
EM RATOS WISTAR ADULTOS INDUZIDOS A MENINGITE PNEUMOCÓCICA NO
PERÍODO INFANTIL**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para obtenção do grau de Farmacêutico Generalista no curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Barichello

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2012

LIEGE DA ROSA FANTIN

**O USO DIÁRIO DO AMBIENTE ENRIQUECIDO PREVINE O DANO COGNITIVO
EM RATOS WISTAR ADULTOS INDUZIDOS A MENINGITE PNEUMOCÓCICA NO
PERÍODO INFANTIL**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Farmacêutico Generalista, no Curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Microbiologia Clínica e Experimental.

Criciúma, 30 de Novembro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Tatiana Barichello - Doutora - (UNESC) – Orientadora

Prof^a. Cleonice Maria Michelon - Mestre - (UNESC)

Prof^o. Paulo Roberto Barbosa - Mestre - (UNESC)

Dedico este trabalho, a minha mais sábia educadora, a pessoa que amo e admiro muito: *Mãe*. Obrigada por estar sempre ao meu lado, confiando em mim e acreditando em meus sonhos.

“Se eu pudesse te fazer eterna, eterna eu te faria!”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus*, pelo seu amor incondicional, que permite tornar os nossos sonhos em realidade.

Aos meus pais, *Eliane* e *Clóvis*, por não medirem esforços para que eu pudesse concluir com êxito a minha formação, sendo assim, essa conquista não é só minha.

A minha amiga e irmã, *Larissa*, pela amizade, companheirismo e por toda ajuda oferecida nesta jornada.

Sou grata a minha avó, *Eloir*, por todo amor dedicado a mim. Por estar sempre presente em todos os momentos, compartilhando as conquistas recebidas em todas as etapas da minha vida e hoje em especial a minha formação acadêmica.

Aos meus tios, *Rinaldo* e *Ana Maria*, pelo apoio e torcida ao meu favor, em especial, a Ana Maria por ter me acolhido de braços abertos em sua casa no momento em que mais precisei, agradeço pela dedicação, companhia e ombro amigo.

Ao meu namorado, *Claitom*, por estar sempre ao meu lado, me incentivando em todos os momentos, com palavras, gestos e atenção.

Expresso meus votos de agradecimentos a todos os meus familiares pelas palavras de coragem e por todo o incentivo dado durante esses quatro anos e meio.

A minha orientadora, professora *Tatiana Barichello*, meus sinceros agradecimentos por ter aceitado gentilmente me orientar, com seu olhar crítico, paciência e vasto conhecimento, muito obrigada por auxiliar na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de microbiologia experimental, os quais foram imprescindíveis para a realização deste estudo, agradeço pelo auxílio e dedicação.

Aos meus colegas do curso de Farmácia, com os quais convivi todos esses anos, em especial a *Caroline Dal Pont, Cleidiane Jung e Tatiana Corrêa*, agradeço a amizade conquistada ao longo deste caminho, pelas alegrias e aflições compartilhadas, pois todos os momentos vividos fizeram com que chegássemos até aqui.

Aos meus amigos, que direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho e torceram por mim, a vocês minha gratidão.

Aos professores do curso de Farmácia, pelo conhecimento compartilhado. A coordenação do curso, pela disposição de escuta e pelo apoio, que nunca mediram seus esforços para nos ajudar.

E a todos os que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho, mesmo não sendo citados, meus sinceros agradecimentos!

Muito Obrigada!

**“A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais voltará a seu tamanho original”.**

Albert Einstein

PARTE I - ARTIGO CIENTÍFICO DESENVOLVIDO NA DISCIPLINA DE TCC II

**EFFECTS OF DAILY ENVIRONMENTAL ENRICHMENT PREVENTS COGNITIVE
IMPAIRMENT IN ADULT RATS WISTAR INDUCED THE PNEUMOCOCCAL
MENINGITIS IN INFANT PERIOD**

Tatiana Barichello¹; Liege R. Fantin¹; Jaqueline S. Generoso¹; Samuel G. Elias¹;
Lutiana R. Simões¹; Clarissa M. Comim²; João Quevedo²

¹ Laboratório de Microbiologia Experimental e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil.

² Laboratório de Neurociências e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil.

Corresponding author:

Profa. Tatiana Barichello, PhD - Laboratório de Microbiologia Experimental, PPGCS, UNASAU, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil. Fax: #55 48 3443 4817. E-mail: tba@unesc.net

ABSTRACT

Bacterial meningitis is characterized by the occurrence of an infectious process in the meninges. The more severe infection is meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*, affecting mainly the extremes of age where children are especially vulnerable. This study aims to evaluate the effects of enriched environment about behavioral parameters in adult Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis during childhood. Wistar rats at 11 days of life were induced to pneumococcal meningitis via cisterna magna, with inoculation of 10 μ l of sterile saline or an equivalent volume of a suspension of *S. pneumoniae* (1×10^6 cfu/ml). In 21 days of life were placed in an enriched environment until they reach adulthood, 60 days of life and they were subjected to behavioral tests of habituation to the open field and inhibitory avoidance task. In the test of habituation to the open field in the training session there was no difference between groups in the number crossing and rearing, showing no impairment in motor and exploratory activity. In meningitis group, there was no difference in the number of crossing and rearing in training session and test session, demonstrating impairment in habituation memory. The groups sham, sham/enriched environment and meningitis/enriched environment showed difference in test session and training, demonstrating habituation memory in these groups. In evaluate aversive memory in training session there was no difference in latency period between groups showing. In meningitis group there was no difference between the training session and the test session demonstrating impaired in memory retention aversive in this group. In group sham, sham/enriched environment and meningitis/enriched environment there was difference between the training session and the test session showing that there was memory retention. Our results found that the use of enriched environment in animals induced by meningitis, proved effective in the recovery of habituation and aversive memory, demonstrating that it has a neuroprotective effect and it was able to reverse the damage caused by meningitis.

Keywords: Bacterial meningitis; *Streptococcus pneumoniae*; Behavior; Memory; Enriched environment.

1. INTRODUCTION

Bacterial meningitis is a serious infection characterized by the presence of an infectious process of the meninges, in the subarachnoid space (Grandgirard et al., 2007). It develops due to the presence bacterial and action of degradation products (Kim, 2010), resulting in the impairment of the central nervous system (CNS) with cognitive impairment and neurological sequelae (Irazuzta et al., 2005; Koedel and Pfister, 1999; Leib et al., 1996). The clinical course of the disease is characterized by tissue cortical necrosis and apoptosis of neurons located in the hippocampal dentate gyrus (Grandgirard et al., 2007), a brain region associated with learning and memory (Nau et al., 1999). A more severe infection is meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* (Brandt, 2010; de Gans and van de Beek, 2002). This microorganism is being found mainly in the upper respiratory tract (Martner et al., 2008), with a mortality rate between 16 to 37% and neurological sequelae estimated 30 to 52% of surviving patients (Mook-Kanamori et al., 2011). The neurological damage include hearing impairment, mental retardation, loss of memory and learning, sensorimotor deficits, seizures and cerebral palsy (Grandgirard et al., 2007; Leib et al., 2000; Leppert et al., 2000; Waage et al., 1989). The disease mainly affects the extremes of age where children are especially vulnerable due to the immaturity of the immune system, with two thirds of deaths (Kim, 2010; Leib et al., 1996). *S. pneumoniae* reaches the CNS cross the blood brain barrier (BBB) via the transcellular mechanism (Kim, 2008). Their replication is fast and occurs simultaneously with the bacterial lysis, release occurring bacterial degradation components that stimulate the release of inflammatory mediators, such as, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1beta (IL-1 β), IL-6 and cytokine-inducing neutrophil chemotaxis (CINC-1) increasing

the inflammatory response of the host (Meli et al., 2006; Rosenthal et al., 2009; van de Beek, 2009). Studies have shown that not only the pathogen exerts harmful effects, but also exacerbated immune response of the host (Andersen, 2007). The cytokines released by cells of the brain in response to bacterial replication, have several actions that can cause, aggravate, mediate or inhibit cellular injury and repair (Allan and Rothwell, 2001). Additionally, the cytokines may damage the blood brain barrier and cause damage in brain (Grandgirard et al., 2007). However, it is known that the promotion of visual and sensory stimuli, as well as social interaction, may have a potential effect on cognitive function affected in meningitis (Nithianantharajah and Hannan, 2006). In literature several experimental models are described which promote neuronal plastic changes in the CNS, for example, the enriched environment (Gobbo and O'Mara, 2005; Nithianantharajah and Hannan, 2006). Among the various neuronal plastic changes generated by the enriched environment within the CNS stands out mainly neurogenesis (van Praag et al., 2000), such changes occur in different cortical regions, in a particular way, the effects observed on the hippocampus animals housed in an enriched environment (Mohammed et al., 2002). This study aims to evaluate the effects of enriched environment about behavioral parameters in adult Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis during childhood.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Infecting organism

S. pneumoniae serotype III was cultured overnight in Todd-Hewitt broth obtained and bacterial growth until the logarithmic phase. On the day of the experiment, the culture was centrifuged for 10 min and resuspended in 0.9% sterile saline solution at a concentration of 1×10^6 cfu/ml (Irazuzta et al., 2001).

2.2. Organization of the experimental groups

The animal model was divided into 4 experimental groups containing 10 animals each, totaling 40 animals for each behavioral test. The experiment was divided into different groups: sham, sham/enriched environment; meningitis and meningitis/enriched environment. The animals were treated with ceftriaxone for 7 days (100 mg/kg twice daily) and were kept with their mothers until the twentieth day of life.

2.3. Animal model of meningitis

Male Wistar rats at 11 days old, weighing 15 to 20 g were obtained from the breeding colony of the UNESC. Meningitis was induced by inoculation of the suspension of *S. pneumoniae* in intracisternally (Irazuzta et al., 2002). On the first day, rats were subjected to puncture the cisterna magna with a 23 gauge needle; the needle position was verified by the free flow of cerebrospinal fluid (CSF) unobstructed. The CSF was removed and animals received 10 μ l of sterile NaCl at a concentration of 0.9% as placebo (sham) or an equivalent volume of the suspension of *S. pneumoniae* (meningitis) (Irazuzta et al., 2002; Irazuzta et al., 2005). Surgical procedures and inoculation of the bacterial suspension were performed under

anesthesia consisting of an intraperitoneal administration of ketamine hydrochloride (6.6 mg/kg), xylazine (0.3 mg/kg) and acepromazine (0.16 mg/kg) (Barichello et al., 2009). Then the animals received 2 ml of saline subcutaneously and analgesic (buprenorphine 0.5 ml subcutaneously every 24 hours) and further returned to their cages and were kept with their mothers (Irazuzta et al., 2001; Irazuzta et al., 2002). Confirmation of infection was confirmed sixteen hours after the induction of meningitis by culturing 5 μ l cerebrospinal fluid, seeded on agar plates 5% sheep blood and incubated at 37°C for 24 hours for colony growth (Grandgirard et al., 2007; Irazuzta et al., 2002; Irazuzta et al., 2001; Sury et al., 2008).

2.4. Model enriched environment

At 20 days of age the animals were weaned. The first contact of the animals with enriched environment has started to complete 21 days of life. The group sham/enriched environment and meningitis/enriched environment were weaned and subjected to enriched environment for three hours a day until they reach 60 days, equivalent to the adult phase. The enriched environment consists of an apparatus 40 x 60 cm delimited by four walls 50 cm in height, with 3 wood and a transparent glass. In this space, various objects were inserted as wheel running, ladders, tubes, Lego cubes, pieces of wood, suspension items, among others. Each week these objects were replaced by new. Were placed in an enriched environment 5 animals for group, so they can use the space comfortably and enjoy the toys inserted (Ickes et al., 2000). The other groups, sham and meningitis, were kept at the biotery of UNESC with food and water available during all periods. At 60 days of age, the animals were randomized and subjected to behavioral tests: Habituation to the open-field task and

Step-down Inhibitory avoidance task after the behavioral tests, the animals were anesthetized and killed by decapitation (guillotine).

2.5. Habituation to the open-field task

The test was carried in an open field of 40 cm x 60 delimited by four walls with 50 cm in height, with 3 of wood and a transparent glass. The floor of the open field is divided in 12 equal quadrant marked by black lines. In the training session, the animals were gently placed on the left rear quadrant of the apparatus and left to explore the environment for 5 minutes. Immediately, the animals return to the box housing. The test session was performed 24 hours after training, in which the procedure is repeated training. The numbers of crossings through the black lines and the number of rearings were evaluated in both sessions (Vianna et al., 2000).

2.6. Step-down inhibitory avoidance task

We used behavioral test called Step-down inhibitory avoidance task. This consists of an acrylic box in which the floor consists of parallel metal bars (1 mm diameter). The spaces between the bars are measuring 1 cm. A platform 7 cm wide and 2.5 cm long was placed together the left wall of the apparatus (Quevedo et al., 1999; Roesler et al., 2003, 2004). In the training session, the animals were placed about the platform and were timed the time that took the animal down with all four paws of the platform. This time is called latency. Immediately after coming down the platform (all 4 paws with) the animal received a shock of 0.4 mA for 2 seconds. In the test session, the animal was again placed on the platform and timed the time that he took to down (latency), but no shock was administered. Latency is classic parameter memory retention (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003).

2.7. Statistics

To the test habituation to the open-field task, the data were analyzed by Student's *t* and expressed as mean \pm standard deviation. Being $*p < 0.05$ compared with the same group training session indicating statistical significance. The difference between the training session and the test session was analyzed using the Student's *t* test.

Data from the Step-down inhibitory avoidance task were analyzed by Student's *t* and expressed as medians and interquartile ranges. Comparisons between groups were performed using Mann-Whitney. Differences within a group were analyzed using the Wilcoxon test. In all comparisons, $*p < 0.05$ indicated statistical significance.

All analyzes were performed using SPSS (Statistical Package for Social Sciences), version 15.0.

3. RESULTS

In Figure 1, we present the test habituation to the open-field task. In the training session there was no difference between groups in relation to number of crossings and rearing to explore the environment (rearing), demonstrating was no injury in motor activity and exploratory. The sham group and sham submitted to enriched environment showed difference between test session when compared to the training session, demonstrating have memory habituation in these groups ($p < 0.05$). Meningitis group, there was no difference in the number of crossing and rearing, between training and test session, demonstrating injury in memory habituation. However, meningitis group submitted to enriched environment was difference between the test session and training session, demonstrating memory habituation in this group ($p < 0.05$).

In Figure 2, we present the test to evaluate aversive memory. In the training session there was no difference between groups in latency time, which is the time it takes for the animal down with all four paws of the platform, demonstrating there was no injury in motor activity. In sham and sham submitted to the enriched environment were difference between the test session and the training session showing that there were memory retention in these groups ($p < 0.05$). Meningitis group there was no difference between the training session and the test session which demonstrated injury in retention of aversive memory in this group. However, meningitis group submitted to enriched environment was difference between the test session and training session, there demonstrating memory retention aversive ($p < 0.05$).

4. DISCUSSION

The brain inflammation due to *S. pneumoniae* is associated both with the deleterious effects of the bacterium and their virulence factors as the effects of the intense inflammatory host response (Leib et al., 1996; Mook-Kanamori et al., 2011). *S. pneumoniae* multiplies rapidly in the CSF, which can colonize the entire surface of the brain and spinal cord (Zwijnenburg et al., 2006). During colonization, bacteria produce a variety of virulence factors, including the polysaccharide capsule, surface of proteins and exotoxin pneumolysin (Darouiche et al., 1992). The major virulence factor is the polysaccharide capsule due to antiphagocytic properties (Jonsson et al., 1985) which also prevents removal of microorganism by mechanical action of mucus (Nelson et al., 2007). The pneumolysin is a determinative virulence factor in pneumococcal meningitis (Mitchell and Andrew, 1997; Paton, 1996), responsible for cholesterol bind of eukaryotic cells, inducing the formation of pores in the membranes of these cells and mainly in mitochondria leading to induction apoptosis-inducing factor (Bhakdi and Trantum-Jensen, 1986; Gilbert et al., 1999). Furthermore, the bacterium has approximately 500 proteins of the surfaces known, which they are the factors of greatest adherence of pathogen (Oggioni et al., 2006). In response to the direct effects of the bacterium, the host starts exacerbated production of inflammatory mediators, including cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 and CINC-1 (van Furth et al., 1996). Studies demonstrate that neuronal cell death, caused in meningitis, could be caused by pneumococcus to induce rapidly increased levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) and calcium, followed by the onset of mitochondrial damage and apoptosis induction (Braun et al., 2001). Experimental studies in animal model of bacterial meningitis, showed an increase in ROS in the hippocampus and cortex after

induction of meningitis (Barichello et al., 2012; Barichello et al., 2011), the brain is particularly vulnerable to oxidative stress and thus ROS appears to contribute to apoptosis and necrosis in meningitis (Leib et al., 1996). As adjunctive therapy in prevention of cognitive impairment the enriched environment is an experimental model that promotes plastic changes in the CNS (Gobbo and O'Mara, 2005; Nithianantharajah and Hannan, 2006). Thus, studies in animals with brain damage, the enriched environment was effective in hippocampal neuronal plasticity, besides improving the cognitive functions affected (van Praag et al., 2000). Diamond et al., (1964) demonstrated that the cerebral cortex of animals housed in an enriched environment showed greater thickness compared to animals living in standard conditions. Recently, studies have demonstrated that the enriched environment can influence the recovery of neurological sequelae, inducing structural changes in the cortex and hippocampus, with increase in the density of dendritic spines and the number of neurons in the dentate gyrus (Johansson and Belichenko, 2002; Puurunen et al., 2001; Tuor et al., 2001). Beyond of structural changes and functional of the brain, the stimulating environment is also considered important to attenuate cognitive deficits and preserve tissue integrity after brain injury in rats (Passineau et al., 2001). In our study the behavioral tests were performed in rats at 60 days of life. In this study, we demonstrated that animals with meningitis induced by *S. pneumoniae* during childhood showed impaired in habituation and aversive memory in adulthood these animals. However, use of enriched environment in animals induced by pneumococcal meningitis, was effective in the recovery of learning and memory. Corroborating with our results Pereira et al., (2007) demonstrated in a study in an animal model of hypoxia-ischemia, that the enriched environment recovered spatial memory deficits observed in the Morris aquatic maze, showing to have a

neuroprotective effect on hippocampal neuronal plasticity. Beauquis et al., (2012) found that an enriched environment prevents glial alterations in the hippocampus triggered early in the pathogenesis of Alzheimer's disease, and also promoted a cell morphology, in animals with the disease, similar to that found in control rats. Another recent study examining the effects of enriched environment about cellular function in the hippocampus showed an initial transient increase in cellular activity and plasticity, which could contribute in the long term to the cellular function and to the hippocampal cognition (Eckert and Abraham, 2012). According Yang et al., (2012) enriched environment prevented the loss of spatial memory and promoted remyelination on aging brain. In our studies, we verified that the animals induced with pneumococcal meningitis and submitted to the enriched environment also demonstrated that this environment had a neuroprotective effect, reversing the loss of memory.

5. CONCLUSION

The pneumococcal meningitis is a potentially fatal disease with high mortality and morbidity leading to neurological sequelae that include loss of learning and memory. In our study, we demonstrated that the use of enriched environment in animals induced by pneumococcal meningitis, proved effective in recovering the habituation and aversive memory showing have a neuroprotective effect as described in several previous studies. Is consensus the fact that environmental stimuli can result in beneficial effects in the prevention of cognitive impairment caused by meningitis. The knowledge of the pathophysiological mechanisms related to the cognitive effects of enriched environment needs to be further elucidated and may present itself as an important adjunctive therapeutic option, especially in children affected with meningitis, where the immature brain is responsive to environmental stimuli.

REFERENCES

- Allan, S.M., Rothwell, N.J. (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 734-744.
- Andersen, C.O. (2007) *Streptococcus pneumoniae* meningitis. Clinical and experimental studies. *Dan. Med. Bull.* 54, 189-209.
- Barichello, T., dos Santos, I., Savi, G.D., Florentino, A.F., Silvestre, C., Comim, C.M., Feier, G., Sachs, D., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., Quevedo, J. (2009) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) levels in the brain and cerebrospinal fluid after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *Neurosci. Lett.* 467, 217-219.
- Barichello, T., Fagundes, G.D., Generoso, J.S., Paula Moreira, A., Costa, C.S., Zanatta, J.R., Simoes, L.R., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Carvalho Vilela, M., Lucio Teixeira, A. (2012) Brain-blood barrier breakdown and pro-inflammatory mediators in neonate rats submitted meningitis by *Streptococcus pneumoniae*. *Brain. Res.* 1471, 162-168.
- Barichello, T., Lemos, J.C., Generoso, J.S., Cipriano, A.L., Milioli, G.L., Marcelino, D.M., Vuolo, F., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Vilela, M.C., Teixeira, A.L. (2011) Oxidative stress, cytokine/chemokine and disruption of blood-brain barrier in neonate rats after meningitis by *Streptococcus agalactiae*. *Neurochem. Res.* 36, 1922-1930.
- Beauquis, J., Pavia, P., Pomilio, C., Vinuesa, A., Podlutskaya, N., Galvan, V., Saravia, F. (2012) Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 239, 28-37.
- Bevilaqua, L.R., Kerr, D.S., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2003) 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.* 17, 897-902.
- Bhakdi, S., Trantum-Jensen, J. (1986) Membrane damage by pore-forming bacterial cytolysins. *Microb. Pathog.* 1, 5-14.
- Brandt, C.T. (2010) Experimental studies of pneumococcal meningitis. *Dan. Med. Bull.* 57, B4119.
- Braun, J.S., Novak, R., Murray, P.J., Eischen, C.M., Susin, S.A., Kroemer, G., Halle, A., Weber, J.R., Tuomanen, E.I., Cleveland, J.L. (2001) Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J. Infect. Dis.* 184, 1300-1309.
- Darouiche, R.O., Hamill, R.J., Greenberg, S.B., Weathers, S.W., Musher, D.M. (1992) Bacterial spinal epidural abscess. Review of 43 cases and literature survey. *Medicine (Baltimore).* 71, 369-385.

de Gans, J., van de Beek, D. (2002) Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N. Engl. J. Med.* 347, 1549-1556.

Diamond, M.C. (2001) Response of the brain to enrichment. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73, 211-220.

Diamond, M.C., Krech, D., Rosenzweig, M.R. (1964) The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 123, 111-120.

Eckert, M.J., Abraham, W.C. (2012) Effects of Environmental Enrichment Exposure on Synaptic Transmission and Plasticity in the Hippocampus. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* *In press.*

Gilbert, R.J., Jimenez, J.L., Chen, S., Tickle, I.J., Rossjohn, J., Parker, M., Andrew, P.W., Saibil, H.R. (1999) Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Cell.* 97, 647-655.

Gobbo, O.L., O'Mara, S.M. (2005) Exercise, but not environmental enrichment, improves learning after kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration in association with an increase in brain-derived neurotrophic factor. *Behav. Brain. Res.* 159, 21-26.

Grandgirard, D., Steiner, O., Tauber, M.G., Leib, S.L. (2007) An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol.* 114, 609-617.

Ickes, B.R., Pham, T.M., Sanders, L.A., Albeck, D.S., Mohammed, A.H., Granholm, A.C. (2000) Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp. Neurol.* 164, 45-52.

Irazuzta, J., Pretzlaff, R.K., DeCourten-Myers, G., Zemlan, F., Zingarelli, B. (2005) Dexamethasone decreases neurological sequelae and caspase activity. *Intensive Care Med.* 31, 146-150.

Irazuzta, J.E., de Courten-Myers, G., Zemlan, F.P., Bekkedal, M.Y., Rossi, J., 3rd (2001) Serum cleaved Tau protein and neurobehavioral battery of tests as markers of brain injury in experimental bacterial meningitis. *Brain. Res.* 913, 95-105.

Irazuzta, J.E., Pretzlaff, R.K., Zingarelli, B., Xue, V., Zemlan, F. (2002) Modulation of nuclear factor-kappaB activation and decreased markers of neurological injury associated with hypothermic therapy in experimental bacterial meningitis. *Crit. Care Med.* 30, 2553-2559.

Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A., Medina, J.H. (1998) Mechanisms for memory types differ. *Nature.* 393, 635-636.

- Johansson, B.B., Belichenko, P.V. (2002) Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 89-96.
- Jonsson, S., Musher, D.M., Chapman, A., Goree, A., Lawrence, E.C. (1985) Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. *J. Infect. Dis.* 152, 4-13.
- Kim, K.S. (2008) Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 625-634.
- Kim, K.S. (2010) Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect. Dis.* 10, 32-42.
- Koedel, U., Pfister, H.W. (1999) Oxidative stress in bacterial meningitis. *Brain. Pathol.* 9, 57-67.
- Leib, S.L., Kim, Y.S., Chow, L.L., Sheldon, R.A., Tauber, M.G. (1996) 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.* 98, 2632-2639.
- Leib, S.L., Leppert, D., Clements, J., Tauber, M.G. (2000) Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect. Immun.* 68, 615-620.
- Leppert, D., Leib, S.L., Grygar, C., Miller, K.M., Schaad, U.B., Hollander, G.A. (2000) Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin. Infect. Dis.* 31, 80-84.
- Martner, A., Dahlgren, C., Paton, J.C., Wold, A.E. (2008) Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect. Immun.* 76, 4079-4087.
- Meli, D.N., Coimbra, R.S., Erhart, D.G., Loquet, G., Bellac, C.L., Tauber, M.G., Neumann, U., Leib, S.L. (2006) Doxycycline reduces mortality and injury to the brain and cochlea in experimental pneumococcal meningitis. *Infect. Immun.* 74, 3890-3896.
- Mitchell, T.J., Andrew, P.W. (1997) Biological properties of pneumolysin. *Microb. Drug Resist.* 3, 19-26.
- Mohammed, A.H., Zhu, S.W., Darmopil, S., Hjerling-Leffler, J., Ernfors, P., Winblad, B., Diamond, M.C., Eriksson, P.S., Bogdanovic, N. (2002) Environmental enrichment and the brain. *Prog. Brain Res.* 138, 109-133.
- Mook-Kanamori, B.B., Geldhoff, M., van der Poll, T., van de Beek, D. (2011) Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 557-591.

Nau, R., Soto, A., Bruck, W. (1999) Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 265-274.

Nelson, A.L., Roche, A.M., Gould, J.M., Chim, K., Ratner, A.J., Weiser, J.N. (2007) Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect. Immun.* 75, 83-90.

Nithianantharajah, J., Hannan, A.J. (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 697-709.

Oggioni, M.R., Trappetti, C., Kadioglu, A., Cassone, M., Iannelli, F., Ricci, S., Andrew, P.W., Pozzi, G. (2006) Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 61, 1196-1210.

Passineau, M.J., Green, E.J., Dietrich, W.D. (2001) Therapeutic effects of environmental enrichment on cognitive function and tissue integrity following severe traumatic brain injury in rats. *Exp. Neurol.* 168, 373-384.

Paton, J.C. (1996) The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Trends Microbiol.* 4, 103-106.

Pereira, L.O., Arteni, N.S., Petersen, R.C., da Rocha, A.P., Achaval, M., Netto, C.A. (2007) Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87, 101-108.

Puurunen, K., Jolkkonen, J., Sirvio, J., Haapalinna, A., Sivenius, J. (2001) An alpha(2)-adrenergic antagonist, atipamezole, facilitates behavioral recovery after focal cerebral ischemia in rats. *Neuropharmacology.* 40, 597-606.

Quevedo, J., Vianna, M.R., Roesler, R., de-Paris, F., Izquierdo, I., Rose, S.P. (1999) 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.* 6, 600-607.

Roesler, R., Schroder, N., Vianna, M.R., Quevedo, J., Bromberg, E., Kapczinski, F., Ferreira, M.B. (2003) Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res.* 975, 207-213.

Rosenthal, L.A., Amineva, S.P., Szakaly, R.J., Lemanske, R.F., Jr., Gern, J.E., Sorkness, R.L. (2009) A rat model of picornavirus-induced airway infection and inflammation. *Virology.* 6, 122.

Sury, M.D., Agarinis, C., Widmer, H.R., Leib, S.L., Christen, S. (2008) JNK is activated but does not mediate hippocampal neuronal apoptosis in experimental neonatal pneumococcal meningitis. *Neurobiol. Dis.* 32, 142-150.

Tuor, U.I., Hudzik, T.J., Malisza, K., Sydserff, S., Kozlowski, P., Del Bigio, M.R. (2001) Long-term deficits following cerebral hypoxia-ischemia in four-week-old rats: correspondence between behavioral, histological, and magnetic resonance imaging assessments. *Exp. Neurol.* 167, 272-281.

van de Beek, D. (2009) Corticosteroids for acute adult bacterial meningitis. *Med. Mal. Infect.* 39, 531-538.

van Furth, A.M., Roord, J.J., van Furth, R. (1996) Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy. *Infect. Immun.* 64, 4883-4890.

van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H. (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 191-198.

Vianna, M.R., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., de Paris, F., Furman, M., de Stein, M.L., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2000) Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn. Mem.* 7, 333-340.

Waage, A., Halstensen, A., Shalaby, R., Brandtzaeg, P., Kierulf, P., Espevik, T. (1989) Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J. Exp. Med.* 170, 1859-1867.

Widman, D.R., Rosellini, R.A. (1990) Restricted daily exposure to environmental enrichment increases the diversity of exploration. *Physiol. Behav.* 47, 57-62.

Yang, S., Lu, W., Zhou, D.S., Tang, Y. (2012) Enriched environment and white matter in aging brain. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 295, 1406-1414.

Zwijnenburg, P.J., van der Poll, T., Roord, J.J., van Furth, A.M. (2006) Chemotactic factors in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis. *Infect. Immun.* 74, 1445-1451.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1: Habituation to the open-field task. The animals (n=10) were divided in different groups: sham, sham/enriched environment (AE), meningitis and meningitis/enriched environment (AE). Data were analyzed by Student's t test and expressed as mean \pm standard deviation. *p<0.05 in relation the same group of training session.

Figure 2: Step-down inhibitory avoidance Task. The animals (n=10) were divided in different groups: sham, sham/enriched environment (AE), meningitis and meningitis/enriched environment (AE). Data were analyzed by Student's t test and expressed as medians and interquartile ranges. *p<0.05 in relation the same group of training session.

Figure 1

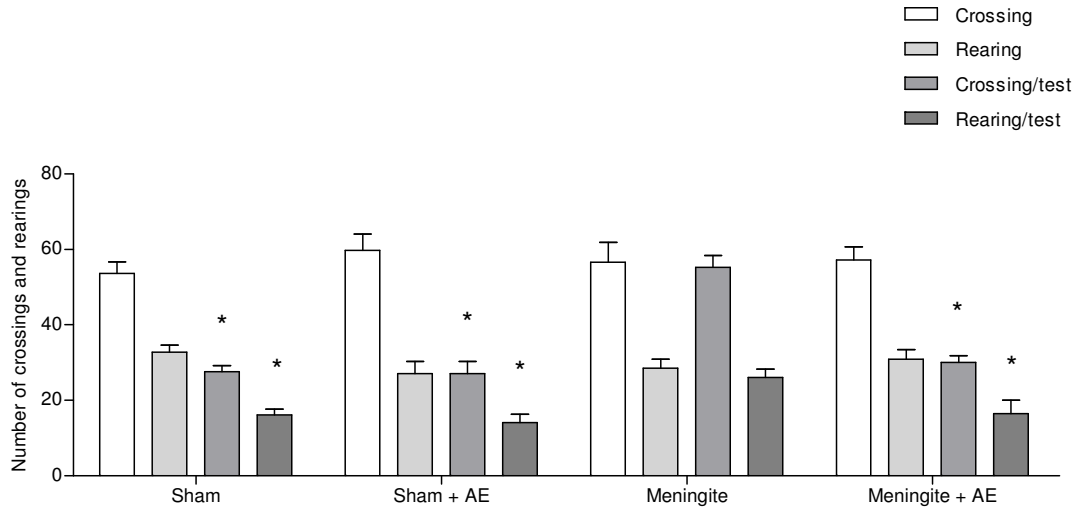
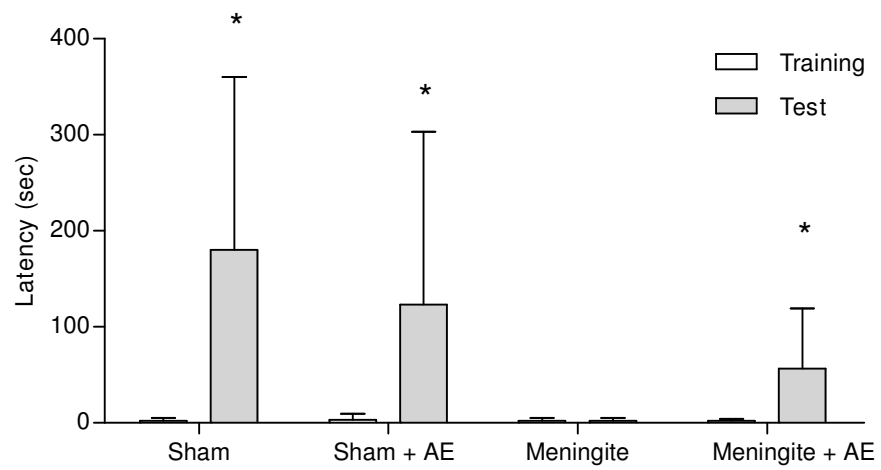


Figure 2



**PARTE II - TRADUÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO DESENVOLVIDO NA
DISCIPLINA DE TCC II**

**O USO DIÁRIO DO AMBIENTE ENRIQUECIDO PREVINE O DANO COGNITIVO
EM RATOS WISTAR ADULTOS INDUZIDOS A MENINGITE PNEUMOCÓCICA NO
PERÍODO INFANTIL**

Tatiana Barichello¹; Liege R. Fantin¹; Jaqueline S. Generoso¹; Samuel G. Elias¹;
Lutiana R. Simões¹; Clarissa M. Comim²; João Quevedo²

¹ Laboratório de Microbiologia Experimental e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil.

² Laboratório de Neurociências e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil.

Autor correspondente:

Profa. Tatiana Barichello, PhD - Laboratório de Microbiologia Experimental, PPGCS, UNASAU, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil. Fax: #55 48 3443 4817. E-mail: tba@unesc.net

RESUMO

A meningite bacteriana caracteriza-se pela ocorrência de um processo infeccioso nas meninges. A infecção mais severa é a meningite ocasionada pelo *Streptococcus pneumoniae*, acometendo principalmente os extremos de idade onde crianças são especialmente vulneráveis. O presente estudo visa avaliar os efeitos do ambiente enriquecido sobre os parâmetros comportamentais em ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica no período infantil. Ratos Wistar com 11 dias de vida foram induzidos à meningite pneumocócica via cisterna magna, com inoculação de 10 µL de solução salina estéril ou volume equivalente de uma suspensão de *S. pneumoniae* (1×10^6 UFC/mL). Ao completarem 21 dias de vida foram acondicionados em um ambiente enriquecido até atingirem a idade adulta, 60 dias de vida e submetidos aos testes comportamentais de habituação ao campo aberto e esquiva inibitória. No teste de habituação ao campo aberto na sessão treino não houve diferença entre os grupos em relação ao número crossing e rearing, demonstrando não haver prejuízo na atividade motora e exploratória. No grupo meningite, não houve diferença no número de crossing e rearing, entre a sessão treino e teste, demonstrando haver prejuízo na memória de habituação. Os grupos sham, sham/ambiente enriquecido e meningite/ambiente enriquecido apresentaram diferença entre a sessão teste e treino, demonstrando haver memória de habituação nestes grupos. No teste para avaliar a memória aversiva na sessão treino não houve diferença entre os grupos no tempo de latência demonstrando não haver prejuízo na atividade motora. No grupo meningite não houve diferença entre a sessão treino e a sessão teste demonstrando haver prejuízo na retenção de memória aversiva neste grupo. Nos grupos sham, sham/ambiente enriquecido e meningite/ambiente enriquecido houve diferença entre a sessão teste e a sessão treino demonstrando que houve retenção de memória. Nossos resultados verificaram que a utilização do ambiente enriquecido em animais induzidos a meningite, mostrou-se eficaz na recuperação da memória de habituação e memória aversiva, demonstrando ter um efeito neuroprotetor, capaz de reverter o quadro de prejuízo na memória ocasionado na meningite.

Palavras-chave: Meningite bacteriana; *Streptococcus pneumoniae*; Comportamento; Memória; Ambiente enriquecido.

1. INTRODUÇÃO

A meningite bacteriana é uma infecção grave caracterizada pela ocorrência de um processo infeccioso das meninges, no espaço subaracnóideo (Grandgirard et al., 2007). Ela se desenvolve decorrente à presença bacteriana e por ação de seus produtos de degradação (Kim, 2010), ocorrendo o comprometimento do sistema nervoso central (SNC) com prejuízos cognitivos e neurológicos (Irazuzta et al., 2005; Koedel and Pfister, 1999; Leib et al., 1996). A evolução clínica da doença caracteriza-se por necrose dos tecidos corticais e apoptose dos neurônios localizado no giro denteado hipocampal (Grandgirard et al., 2007), região do cérebro associada ao aprendizado e a memória (Nau et al., 1999). A infecção mais severa é a meningite ocasionada pelo *Streptococcus pneumoniae* (Brandt, 2010; de Gans and van de Beek, 2002). Este microrganismo é um oportunista comensal sendo encontrado principalmente no trato respiratório superior (Martner et al., 2008), apresentando uma taxa de mortalidade entre 16 a 37% e sequelas neurológicas estimadas em 30 a 52% dos pacientes sobreviventes (Mook-Kanamori et al., 2011). Os danos neurológicos incluem deficiência auditiva, retardo mental, prejuízos de memória e aprendizagem, déficits sensório-motor, convulsões e paralisia cerebral (Grandgirard et al., 2007; Leib et al., 2000; Leppert et al., 2000; Waage et al., 1989). A doença acomete principalmente os extremos de idade onde crianças são especialmente vulneráveis, devido à imaturidade do sistema imunológico, apresentando dois terços das mortes (Kim, 2010; Leib et al., 1996). O *S. pneumoniae* para atingir o SNC, atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) através do mecanismo transcelular (Kim, 2008). Sua replicação é rápida e acontece simultaneamente com a lise bacteriana, ocorrendo liberação de seus componentes

bacterianos de degradação que estimulam a liberação de mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1beta (IL-1 β), IL-6 e a citocina quimiotática indutora de neutrófilos (CINC-1) aumentando a resposta inflamatória do hospedeiro (Meli et al., 2006; Rosenthal et al., 2009; van de Beek, 2009). Estudos revelam que não só o patógeno exerce efeitos nocivos, mas também a resposta imune exacerbada do hospedeiro (Andersen, 2007). As citocinas liberadas pelas células do cérebro em resposta a replicação bacteriana, possuem diversas ações que podem causar, agravar, mediar ou inibir a lesão e reparação celular (Allan and Rothwell, 2001). Além disso, as citocinas podem contribuir para comprometimento da BHE e danos cerebrais (Grandgirard et al., 2007). Entretanto, sabe-se que a promoção de estímulos visuais e sensoriais, bem como a interação social, pode ter um efeito potencial sobre a função cognitiva afetada na meningite (Nithianantharajah and Hannan, 2006). Na literatura são descritos diversos modelos experimentais que promovem modificações plásticas no SNC, como por exemplo, o ambiente enriquecido (Gobbo and O'Mara, 2005; Nithianantharajah and Hannan, 2006). Dentre as diversas mudanças plásticas geradas pelo ambiente enriquecido no SNC destaca-se principalmente a neurogênese (van Praag et al., 2000), tais mudanças ocorrem em diversas regiões corticais, sendo que se destacam de forma particular, os efeitos observados sobre o hipocampo de animais condicionados em um ambiente enriquecido (Mohammed et al., 2002). O presente estudo visa avaliar os efeitos do ambiente enriquecido sobre os parâmetros comportamentais em ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica no período infantil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. *Microorganismo infectante*

S. pneumoniae sorotipo III foi cultivado durante a noite em caldo Todd-Hewitt e obtido crescimento bacteriano até a fase logarítmica. No dia do experimento, a cultura foi centrifugada por 10 min e ressuspendida em solução salina 0,9% estéril na concentração de 1×10^6 UFC/mL (Irazuzta et al., 2001).

2.2. *Organização dos grupos experimentais*

O modelo animal foi organizado em 4 grupos experimentais, contendo 10 animais em cada grupo, totalizando 40 animais para cada teste comportamental. O experimento foi dividido em diferentes grupos: sham; sham/ambiente enriquecido; meningite e meningite/ambiente enriquecido. Os animais receberam tratamento com ceftriaxona, durante 7 dias (100 mg/Kg, duas vezes ao dia) e foram mantidos com suas mães até o vigésimo dia de vida.

2.3. *Modelo animal de meningite*

Ratos Wistar machos com 11 dias de vida, pesando entre 15 a 20 g, foram obtidos a partir da colônia de reprodução do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC. A meningite foi induzida pela inoculação da suspensão de *S. pneumoniae* na cisterna magna dos animais (Irazuzta et al., 2002). No primeiro dia, os ratos foram submetidos a uma punção na cisterna magna com uma agulha número 23, a posição da agulha foi verificada pelo fluxo livre do líquido cefalorraquidiano (LCR) desobstruído. O LCR foi retirado e os animais receberam 10 μ L de solução estéril de NaCl na concentração de 0,9% como placebo (sham) ou

volume equivalente da suspensão de *S. pneumoniae* (meningite) (Irazuzta et al., 2005; Irazuzta et al., 2002). Os procedimentos cirúrgicos e inoculação da suspensão bacteriana foram executados sob a anestesia que consiste em uma administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina (6,6 mg/kg), xilazina (0,3 mg/kg), e acepromazina (0,16 mg/kg) (Barichello et al., 2009). Em seguida, os animais receberam 2 mL de salina subcutaneamente e analgésico (0,5 mL de buprenorfina subcutaneamente a cada 24 horas) e após retornaram para as suas gaiolas e foram mantidos com suas mães (Irazuzta et al., 2001; Irazuzta et al., 2002). A confirmação da infecção foi confirmada dezesseis horas após a indução da meningite através da cultura de 5 µL de LRC, semeado em placas de ágar sangue de carneiro 5%, incubadas na temperatura de 37°C durante 24 horas para crescimento das colônias (Grandgirard et al., 2007; Irazuzta et al., 2001; Irazuzta et al., 2002; Sury et al., 2008).

2.4. Modelo de ambiente enriquecido

Aos 20 dias de vida os animais foram desmamados. O primeiro contato dos animais com o ambiente enriquecido iniciou ao completarem 21 dias de vida. Os grupos sham/ambiente enriquecido e meningite/ambiente enriquecido foram desmamados e submetidos ao ambiente enriquecido durante três horas diárias até atingirem 60 dias de vida, o que equivale a fase adulta. O ambiente enriquecido consiste em um aparato de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. Neste espaço, foram inseridos vários objetos como roda de corrida, escadas, tubos, cubos de Lego, peças de madeira, itens de suspensão, dentre outros. A cada semana estes objetos foram substituídos por novos (Diamond, 2001; Widman and Rosellini, 1990). Foram

dispostos no ambiente enriquecido 5 animais por grupo, para que possam utilizar do espaço confortavelmente e desfrutar dos brinquedos inseridos (Ickes et al., 2000). Os demais grupos, sham e meningite, foram mantidos no biotério da UNESC com alimento e água disponíveis durante todos os períodos. Aos 60 dias de vida, os animais foram randomizados e submetidos aos testes comportamentais: Habituação ao Campo Aberto e Esquiva Inibitória, após os testes comportamentais os animais foram anestesiados e mortos por decapitação (guilhotina).

2.5. Habituação ao Campo Aberto

O teste foi realizado em um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho e deixados explorar livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repete o procedimento do treino. Os números de cruzamentos (crossings) através das linhas pretas e o número de levantamentos (rearings) foram avaliados em ambas as sessões (Vianna et al., 2000).

2.6. Esquiva Inibitória

Foi utilizado o teste comportamental denominado Esquiva Inibitória. Este consiste em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal (1 mm de diâmetro). Os espaços entre as barras medem 1 cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento foi colocada junto à

parede esquerda do aparelho (Quevedo et al., 1999; Roesler et al., 2003). Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e foi cronometrado o tempo que o animal levou para descer com as quatro patas da plataforma. Esse tempo é denominado latência. Imediatamente após descer da plataforma (com as 4 patas), o animal recebeu um choque de 0,4 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e cronometrado o tempo que ele levou para descer (latência), porém, não foi administrado choque. A latência é parâmetro clássico de retenção de memória. O intervalo entre a sessão treino e a sessão teste foi de 24 horas (Bevilaqua et al., 2003; Izquierdo et al., 1998).

2.7. Estatísticas

Para o teste de habituação ao campo aberto, os dados foram analisados pelo teste Student t e expressos em média \pm desvio padrão. Sendo $*p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo da sessão treino indicando significância estatística. A diferença entre a sessão de treino e a sessão de teste foi analisada através do teste de Student t.

Os dados do teste de esQUIVA inibitória foram analisados pelo teste Student t e expressos como faixas medianas e intervalo interquartil. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando testes de Mann-Whitney. As diferenças entre um mesmo grupo foram analisadas através do teste de Wilcoxon. Em todas as comparações, $*p < 0,05$ indicou significância estatística.

Todas as análises foram executadas utilizando o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 15.0.

3. RESULTADOS

Na figura 1, apresentamos o teste memória de habituação ao campo aberto. Na sessão treino não houve diferença entre os grupos em relação ao número de cruzamentos (crossing) e levantamentos para explorar o ambiente (rearing), demonstrando não haver prejuízo na atividade motora e exploratória. Os grupos sham e sham submetidos ao ambiente enriquecido apresentaram diferença entre a sessão teste quando comparado à sessão treino, demonstrando haver memória de habituação nestes grupos ($p < 0,05$). No grupo meningite, não houve diferença no número de crossing e rearing, entre a sessão treino e teste, demonstrando haver prejuízo na memória de habituação. Entretanto, no grupo meningite submetidos ao ambiente enriquecido houve diferença entre a sessão teste e a sessão treino, demonstrando haver memória de habituação neste grupo ($p < 0,05$).

Na figura 2, apresentamos o teste para avaliar a memória aversiva. Na sessão treino não houve diferença entre os grupos no tempo de latência, que é o tempo que o animal leva para descer com as quatro patas da plataforma, demonstrando não haver prejuízo na atividade motora. Nos grupos sham e sham submetido ao ambiente enriquecido houve diferença entre a sessão teste e a sessão treino demonstrando que houve retenção de memória ($p < 0,05$). No grupo meningite não houve diferença entre a sessão treino e a sessão teste demonstrando haver prejuízo na memória aversiva neste grupo. Entretanto, no grupo meningite submetidos ao ambiente enriquecido houve diferença entre a sessão teste e a sessão treino, demonstrando haver retenção de memória aversiva ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A inflamação no cérebro devido ao *S. pneumoniae* está associada tanto com os efeitos deletérios da bactéria e seus fatores de virulência quanto aos efeitos da intensa resposta inflamatória do hospedeiro (Leib et al., 1996; Mook-Kanamori et al., 2011). O *S. pneumoniae* multiplica-se rapidamente no LCR, podendo colonizar toda a superfície do cérebro e da medula espinhal (Zwijnenburg et al., 2006). Durante a colonização, a bactéria produz uma diversidade de fatores de virulência, incluindo a cápsula de polissacarídeo, proteínas de superfície e a exotoxina pneumolisina (Darouiche et al., 1992). O principal fator de virulência é a cápsula de polissacarídeos devido às propriedades antifagocíticas (Jonsson et al., 1985) que também impede a remoção do microrganismo pela ação mecânica do muco (Nelson et al., 2007). A pneumolisina é um fator de virulência determinante na meningite pneumocócica (Mitchell and Andrew, 1997; Paton, 1996), responsável por ligar-se ao colesterol das células eucarióticas, induzindo a formação de poros nas membranas destas células e principalmente nas mitocôndrias levando a indução do fator indutor de apoptose (Bhakdi and Trantum-Jensen, 1986; Gilbert et al., 1999). Além disso, a bactéria possui em torno de 500 proteínas de superfícies conhecidas, que são os fatores de maior aderência do patógeno (Oggioni et al., 2006). Em resposta aos efeitos diretos da bactéria, inicia no hospedeiro a produção exacerbada de mediadores inflamatórios, que incluem as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e a CINC-1 (van Furth et al., 1996). Estudos demonstram que a morte celular neuronal, ocasionada na meningite, poderia ser ocasionada pelo pneumococo ao induzir rapidamente o aumento nos níveis intracelulares de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e cálcio, seguido pelo início do dano mitocondrial e a indução da apoptose

(Braun et al., 2001). Estudos experimentais em modelo animal de meningite bacteriana, demonstraram um aumento das EROs no hipocampo e córtex, após indução da meningite (Barichello et al., 2012; Barichello et al., 2011), o cérebro é particularmente vulnerável ao stress oxidativo, assim as EROs parece contribuir para necrose e apoptose na meningite (Leib et al., 1996). Como terapia adjuvante na prevenção do dano cognitivo o ambiente enriquecido é um modelo experimental que promove modificações plásticas no SNC (Gobbo and O'Mara, 2005; Nithianantharajah and Hannan, 2006). Deste modo, estudos em animais com dano encefálico, o ambiente enriquecido mostrou-se eficaz na plasticidade neuronal hipocampal, além de melhorar as funções cognitivas afetadas (van Praag et al., 2000). Diamond et al., (1964) demonstraram que o córtex cerebral de animais condicionados em um ambiente enriquecido, apresentou maior espessura em comparação com animais que vivem em condições padrão. Recentemente, foram demonstrados em estudos que o ambiente enriquecido pode influenciar na recuperação de sequelas neurológicas, induzindo mudanças estruturais no córtex e hipocampo, com aumento na densidade dos espinhos dendríticos e do número de neurônios no giro denteado (Johansson and Belichenko, 2002; Puurunen et al., 2001; Tuor et al., 2001). Além das alterações estruturais e funcionais do encéfalo, a estimulação ambiental é também considerada importante para atenuar déficit cognitivo e preservar a integridade tecidual após lesão cerebral em ratos (Passineau et al., 2001). Em nosso estudo os testes comportamentais foram realizados em ratos com 60 dias de vida, que compreende a fase adulta. Neste estudo, demonstramos que os animais induzidos à meningite por *S. pneumoniae* no período infantil apresentaram prejuízo na memória de habituação e na memória aversiva na vida adulta destes animais. Entretanto, a utilização do ambiente enriquecido em animais

induzidos a meningite pneumocócica, mostrou-se eficaz na recuperação da aprendizagem e da memória. Corroborando com nossos resultados Pereira et al., (2007), demonstraram em um estudo feito em modelo animal de hipóxia-isquêmica, que o ambiente enriquecido recuperou o déficit de memória espacial, observadas no labirinto aquático de Morris, mostrando ter efeito neuroprotetor na plasticidade neuronal hipocampal. Beauquis et al., (2012) verificaram que o ambiente enriquecido impediu alterações gliais no hipocampo desencadeado precocemente na patogênese da doença de Alzheimer, além de ter promovido uma morfologia celular, nos animais com a doença, semelhante ao encontrado nos ratos do grupo controle. Outro estudo recente, examinando os efeitos do ambiente enriquecido sobre a função celular no hipocampo, demonstrou um aumento inicial transitório na atividade celular e na plasticidade, que em longo prazo poderia surtir melhoras na função celular e contribuir para a cognição hipocampal (Eckert and Abraham, 2012). Segundo Yang et al., (2012), o ambiente enriquecido preveniu a perda de memória espacial e promoveu a remielinização no cérebro envelhecido. Em nossos estudos, nós verificamos que os animais induzidos à meningite pneumocócica e submetidos ao ambiente enriquecido, também demonstraram que este ambiente teve um efeito neuroprotetor, revertendo o quadro de prejuízo na memória.

5. CONCLUSÃO

A meningite pneumocócica é uma doença potencialmente fatal com altas taxas de mortalidade e morbidade levando a sequelas neurológicas que incluem prejuízo de aprendizagem e memória. Em nosso estudo, demonstramos que a utilização do ambiente enriquecido em animais induzidos a meningite pneumocócica, mostrou-se eficaz na recuperação da memória de habituação e da memória aversiva, mostrando ter um efeito neuroprotetor como descrito em vários estudos anteriores. É consensual o fato de que a estimulação ambiental pode resultar em efeitos benéficos na prevenção de déficits cognitivos ocasionados pela meningite. O conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos relacionados aos efeitos cognitivos do ambiente enriquecido precisa ainda ser mais elucidado e pode apresentar-se como importante opção terapêutica coadjuvante, principalmente em crianças acometidas com meningite, onde o cérebro imaturo é responsivo aos estímulos do meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- Allan, S.M., Rothwell, N.J. (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 734-744.
- Andersen, C.O. (2007) *Streptococcus pneumoniae* meningitis. Clinical and experimental studies. *Dan. Med. Bull.* 54, 189-209.
- Barichello, T., dos Santos, I., Savi, G.D., Florentino, A.F., Silvestre, C., Comim, C.M., Feier, G., Sachs, D., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., Quevedo, J. (2009) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) levels in the brain and cerebrospinal fluid after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *Neurosci. Lett.* 467, 217-219.
- Barichello, T., Fagundes, G.D., Generoso, J.S., Paula Moreira, A., Costa, C.S., Zanatta, J.R., Simoes, L.R., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Carvalho Vilela, M., Lucio Teixeira, A. (2012) Brain-blood barrier breakdown and pro-inflammatory mediators in neonate rats submitted meningitis by *Streptococcus pneumoniae*. *Brain. Res.* 1471, 162-168.
- Barichello, T., Lemos, J.C., Generoso, J.S., Cipriano, A.L., Milioli, G.L., Marcelino, D.M., Vuolo, F., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Vilela, M.C., Teixeira, A.L. (2011) Oxidative stress, cytokine/chemokine and disruption of blood-brain barrier in neonate rats after meningitis by *Streptococcus agalactiae*. *Neurochem. Res.* 36, 1922-1930.
- Beauquis, J., Pavia, P., Pomilio, C., Vinuesa, A., Podlutskaya, N., Galvan, V., Saravia, F. (2012) Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 239, 28-37.
- Bevilaqua, L.R., Kerr, D.S., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2003) 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.* 17, 897-902.
- Bhakdi, S., Trantum-Jensen, J. (1986) Membrane damage by pore-forming bacterial cytolysins. *Microb. Pathog.* 1, 5-14.
- Brandt, C.T. (2010) Experimental studies of pneumococcal meningitis. *Dan. Med. Bull.* 57, B4119.
- Braun, J.S., Novak, R., Murray, P.J., Eischen, C.M., Susin, S.A., Kroemer, G., Halle, A., Weber, J.R., Tuomanen, E.I., Cleveland, J.L. (2001) Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J. Infect. Dis.* 184, 1300-1309.
- Darouiche, R.O., Hamill, R.J., Greenberg, S.B., Weathers, S.W., Musher, D.M. (1992) Bacterial spinal epidural abscess. Review of 43 cases and literature survey. *Medicine (Baltimore).* 71, 369-385.

de Gans, J., van de Beek, D. (2002) Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N. Engl. J. Med.* 347, 1549-1556.

Diamond, M.C. (2001) Response of the brain to enrichment. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73, 211-220.

Diamond, M.C., Krech, D., Rosenzweig, M.R. (1964) The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 123, 111-120.

Eckert, M.J., Abraham, W.C. (2012) Effects of Environmental Enrichment Exposure on Synaptic Transmission and Plasticity in the Hippocampus. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* *In press.*

Gilbert, R.J., Jimenez, J.L., Chen, S., Tickle, I.J., Rossjohn, J., Parker, M., Andrew, P.W., Saibil, H.R. (1999) Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Cell.* 97, 647-655.

Gobbo, O.L., O'Mara, S.M. (2005) Exercise, but not environmental enrichment, improves learning after kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration in association with an increase in brain-derived neurotrophic factor. *Behav. Brain. Res.* 159, 21-26.

Grandgirard, D., Steiner, O., Tauber, M.G., Leib, S.L. (2007) An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol.* 114, 609-617.

Ickes, B.R., Pham, T.M., Sanders, L.A., Albeck, D.S., Mohammed, A.H., Granholm, A.C. (2000) Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp. Neurol.* 164, 45-52.

Irazuzta, J., Pretzlaff, R.K., DeCourten-Myers, G., Zemlan, F., Zingarelli, B. (2005) Dexamethasone decreases neurological sequelae and caspase activity. *Intensive Care Med.* 31, 146-150.

Irazuzta, J.E., de Courten-Myers, G., Zemlan, F.P., Bekkedal, M.Y., Rossi, J., 3rd (2001) Serum cleaved Tau protein and neurobehavioral battery of tests as markers of brain injury in experimental bacterial meningitis. *Brain. Res.* 913, 95-105.

Irazuzta, J.E., Pretzlaff, R.K., Zingarelli, B., Xue, V., Zemlan, F. (2002) Modulation of nuclear factor-kappaB activation and decreased markers of neurological injury associated with hypothermic therapy in experimental bacterial meningitis. *Crit. Care Med.* 30, 2553-2559.

Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A., Medina, J.H. (1998) Mechanisms for memory types differ. *Nature.* 393, 635-636.

- Johansson, B.B., Belichenko, P.V. (2002) Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 89-96.
- Jonsson, S., Musher, D.M., Chapman, A., Goree, A., Lawrence, E.C. (1985) Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. *J. Infect. Dis.* 152, 4-13.
- Kim, K.S. (2008) Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 625-634.
- Kim, K.S. (2010) Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect. Dis.* 10, 32-42.
- Koedel, U., Pfister, H.W. (1999) Oxidative stress in bacterial meningitis. *Brain. Pathol.* 9, 57-67.
- Leib, S.L., Kim, Y.S., Chow, L.L., Sheldon, R.A., Tauber, M.G. (1996) 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.* 98, 2632-2639.
- Leib, S.L., Leppert, D., Clements, J., Tauber, M.G. (2000) Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect. Immun.* 68, 615-620.
- Leppert, D., Leib, S.L., Grygar, C., Miller, K.M., Schaad, U.B., Hollander, G.A. (2000) Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin. Infect. Dis.* 31, 80-84.
- Martner, A., Dahlgren, C., Paton, J.C., Wold, A.E. (2008) Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect. Immun.* 76, 4079-4087.
- Meli, D.N., Coimbra, R.S., Erhart, D.G., Loquet, G., Bellac, C.L., Tauber, M.G., Neumann, U., Leib, S.L. (2006) Doxycycline reduces mortality and injury to the brain and cochlea in experimental pneumococcal meningitis. *Infect. Immun.* 74, 3890-3896.
- Mitchell, T.J., Andrew, P.W. (1997) Biological properties of pneumolysin. *Microb. Drug Resist.* 3, 19-26.
- Mohammed, A.H., Zhu, S.W., Darmopil, S., Hjerling-Leffler, J., Ernfors, P., Winblad, B., Diamond, M.C., Eriksson, P.S., Bogdanovic, N. (2002) Environmental enrichment and the brain. *Prog. Brain Res.* 138, 109-133.
- Mook-Kanamori, B.B., Geldhoff, M., van der Poll, T., van de Beek, D. (2011) Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 557-591.

Nau, R., Soto, A., Bruck, W. (1999) Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 265-274.

Nelson, A.L., Roche, A.M., Gould, J.M., Chim, K., Ratner, A.J., Weiser, J.N. (2007) Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect. Immun.* 75, 83-90.

Nithianantharajah, J., Hannan, A.J. (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 697-709.

Oggioni, M.R., Trappetti, C., Kadioglu, A., Cassone, M., Iannelli, F., Ricci, S., Andrew, P.W., Pozzi, G. (2006) Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 61, 1196-1210.

Passineau, M.J., Green, E.J., Dietrich, W.D. (2001) Therapeutic effects of environmental enrichment on cognitive function and tissue integrity following severe traumatic brain injury in rats. *Exp. Neurol.* 168, 373-384.

Paton, J.C. (1996) The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Trends Microbiol.* 4, 103-106.

Pereira, L.O., Arteni, N.S., Petersen, R.C., da Rocha, A.P., Achaval, M., Netto, C.A. (2007) Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87, 101-108.

Puurunen, K., Jolkkonen, J., Sirvio, J., Haapalinna, A., Sivenius, J. (2001) An alpha(2)-adrenergic antagonist, atipamezole, facilitates behavioral recovery after focal cerebral ischemia in rats. *Neuropharmacology.* 40, 597-606.

Quevedo, J., Vianna, M.R., Roesler, R., de-Paris, F., Izquierdo, I., Rose, S.P. (1999) 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.* 6, 600-607.

Roesler, R., Schroder, N., Vianna, M.R., Quevedo, J., Bromberg, E., Kapczinski, F., Ferreira, M.B. (2003) Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res.* 975, 207-213.

Rosenthal, L.A., Amineva, S.P., Szakaly, R.J., Lemanske, R.F., Jr., Gern, J.E., Sorkness, R.L. (2009) A rat model of picornavirus-induced airway infection and inflammation. *Virology.* 6, 122.

Sury, M.D., Agarinis, C., Widmer, H.R., Leib, S.L., Christen, S. (2008) JNK is activated but does not mediate hippocampal neuronal apoptosis in experimental neonatal pneumococcal meningitis. *Neurobiol. Dis.* 32, 142-150.

Tuor, U.I., Hudzik, T.J., Malisza, K., Sydserff, S., Kozlowski, P., Del Bigio, M.R. (2001) Long-term deficits following cerebral hypoxia-ischemia in four-week-old rats: correspondence between behavioral, histological, and magnetic resonance imaging assessments. *Exp. Neurol.* 167, 272-281.

van de Beek, D. (2009) Corticosteroids for acute adult bacterial meningitis. *Med. Mal. Infect.* 39, 531-538.

van Furth, A.M., Roord, J.J., van Furth, R. (1996) Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy. *Infect. Immun.* 64, 4883-4890.

van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H. (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 191-198.

Vianna, M.R., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., de Paris, F., Furman, M., de Stein, M.L., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2000) Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn. Mem.* 7, 333-340.

Waage, A., Halstensen, A., Shalaby, R., Brandtzaeg, P., Kierulf, P., Espevik, T. (1989) Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J. Exp. Med.* 170, 1859-1867.

Widman, D.R., Rosellini, R.A. (1990) Restricted daily exposure to environmental enrichment increases the diversity of exploration. *Physiol. Behav.* 47, 57-62.

Yang, S., Lu, W., Zhou, D.S., Tang, Y. (2012) Enriched environment and white matter in aging brain. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 295, 1406-1414.

Zwijnenburg, P.J., van der Poll, T., Roord, J.J., van Furth, A.M. (2006) Chemotactic factors in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis. *Infect. Immun.* 74, 1445-1451.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1: Memória de habituação ao campo aberto. Os animais (n=10) foram divididos em diferentes grupos: sham, sham/ambiente enriquecido (AE), meningite e meningite/ambiente enriquecido (AE). Os dados foram analisados pelo teste Student t, e expressos em média \pm desvio padrão. *p<0,05 em relação ao mesmo grupo da sessão treino.

Figura 2: Teste da esquiva inibitória. Os animais (n=10) foram divididos em diferentes grupos: sham, sham/ambiente enriquecido (AE), meningite e meningite/ambiente enriquecido (AE). Os dados foram analisados pelo teste Mann-Whitney, e expressos em faixas medianas e intervalo interquartil. *p<0,05 em relação ao mesmo grupo da sessão treino.

Figura 1

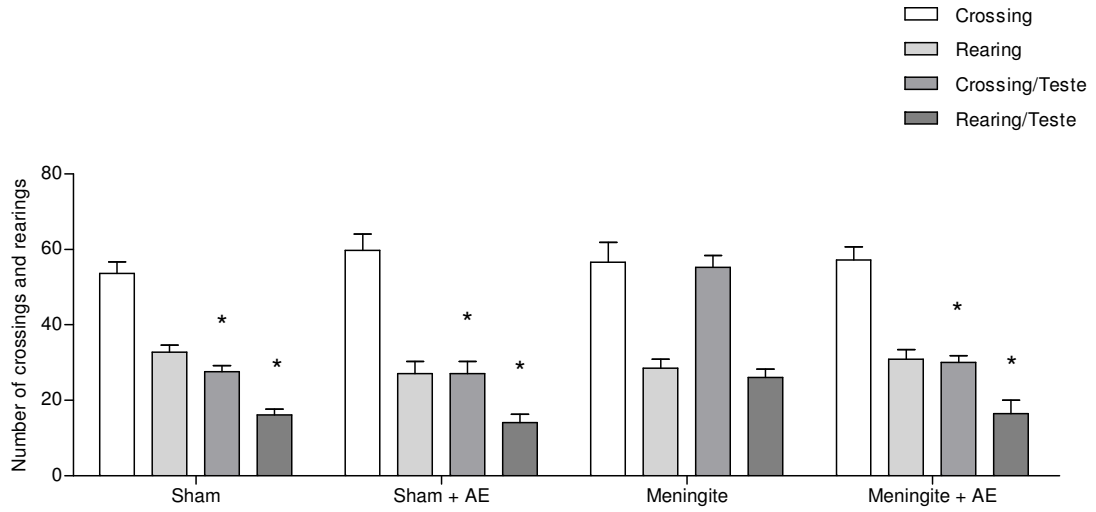


Figura 2

