

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA EXPERIMENTAL - LME
CURSO DE FARMÁCIA

CAROLINE SILVA DA COSTA

ATENUAÇÃO DO COMPROMETIMENTO COGNITIVO PELO
ANTIBIÓTICO NÃO-BACTERIOLÍTICO DAPTOMICINA EM RATOS
WISTAR SUBMETIDOS À MENINGITE PNEUMOCÓCICA

CRICIÚMA, JUNHO DE 2013.

CAROLINE SILVA DA COSTA

**ATENUAÇÃO DO COMPROMETIMENTO COGNITIVO PELO
ANTIBIÓTICO NÃO-BACTERIOLÍTICO DAPTOMICINA EM RATOS
WISTAR SUBMETIDOS À MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Barichello

CRICIÚMA, JUNHO DE 2013.

Dedico este trabalho aos meus pais, Celói e Ronaldo, meus primeiros e maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, e pelas oportunidades, que somente Ele tem o poder de proporcionar.

Aos meus pais, Celói e Ronaldo, por me incentivarem desde criança a concluir minha formação, pelo amor, apoio e compreensão com que tantas vezes ouviram meu desabafo e me deram força para continuar lutando, segurando minha mão para que eu não desistisse.

Ao meu namorado Vagner, pela paciência, amor e carinho com que me tratou nessa longa fase de estudos, estando sempre disposto a ouvir e ajudar. A saudade fez nosso amor mais forte!

Aos meus irmãos, Júlio e Pedro Afonso, pelo apoio, companhia e atenção nos fins de semana, tornando-os mais divertidos.

As minhas primas, Ana Paula e Sintia, pelos anos de convivência e momentos compartilhados, que sem dúvida contribuíram muito para meu crescimento pessoal.

À todos os meus familiares, por terem me apoiado e se preocupado nesse período em que estive distante para conclusão dos meus estudos.

À minha orientadora Tatiana Barichello, por ter me acolhido como sua aluna de Iniciação Científica, e ter me ensinado, com paciência e dedicação, a gostar imensamente da Ciência. Eu não poderia ter escolhido outro orientador com tanta capacidade.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Experimental, pelos dois anos e meio de trabalho árduo e gratificante; à Jaqueline, nossa sub-chefe, que tanto me auxiliou, e desde o início se mostrou pronta para ajudar; Lutiana e Grazieli, pelos anos de trabalho, e em especial, a Ana Paula e Samuel, meus grandes amigos, companheiros de experimento, responsáveis por me ensinar que o trabalho também pode ser divertido. Vou sentir muita falta de vocês, pessoal!

Aos meus colegas de curso, e futuros companheiros de profissão, pelas amizades e conhecimentos compartilhados, pelos anos de convivência, pela companhia nas aulas e risadas e brincadeiras nos intervalos. A faculdade não seria a mesma sem vocês.

Aos meus professores, pela atenção, dedicação e paciência com que

passaram seus conhecimentos. Por responderem sempre as minhas dúvidas com interesse, mesmo elas sendo inúmeras. Pela importância que tem em minha formação e pela amizade construída, sempre serão meus espelhos profissionais.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui, direta ou indiretamente, com palavras, gestos, atenção e amizade. Dedico essa conquista aos que sempre estiveram do meu lado.

Muito obrigada!

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

PARTE I – ARTIGO CIENTÍFICO DESENVOLVIDO NA DISCIPLINA DE TCC II	9
PARTE II – TRADUÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO ELABORADO NA DISCIPLINA DE TCC II.....	33

PARTE I – ARTIGO CIENTÍFICO DESENVOLVIDO NA DISCIPLINA DE TCC II

RESEARCH ARTICLE**Open Access**

Attenuation of cognitive impairment by the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin in Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis

Tatiana Barichello^{1,3,4*}, João Carlos Nepomuceno Gonçalves^{1,3,4}, Jaqueline S Generoso^{1,3,4}, Grazielle L Milioli^{1,3,4}, Gntia Silvestre^{1,3,4}, Caroline S Costa^{1,3,4}, Jaqueline da Rosa Coelho^{1,3,4}, Clarissa M Comim^{2,3,4} and João Quevedo^{2,3,4}

Abstract

Background: *Streptococcus pneumoniae* is associated with neurologic sequels, such as, seizures, sensory-motor deficits, hearing loss, learning and memory impairment, which can occur in approximately 30 to 52% of surviving patients. Neuronal damage can be caused by intense inflammatory reaction and direct effects of the bacteria virulence factors. The aim of the present study was to evaluate the effects of the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin versus ceftriaxone on behavioral parameters in adult Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis.

Results: Ten days after induction we verified that the meningitis group with daptomycin treatment showed retention of aversive memory; it presented memory of the object recognition at short term and long term. In continuous multiple-trials step-down inhibitory avoidance task the meningitis group with ceftriaxone treatment required approximately two times more stimulus to reach the acquisition criterion when compared with meningitis group with daptomycin treatment. However, in the habituation memory test there were no differences in the number of crossings and rearings in training and task sessions demonstrating habituation impairment to the environment task in both meningitis groups.

Conclusions: The evidence of the present study shows the potential alternative of the treatment with daptomycin in preventing learning and memory impairments caused by pneumococcal meningitis. Further investigations are necessary to provide support for evaluation of daptomycin as an alternative treatment of bacterial meningitis.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, Meningitis, Behavior, Memory, Daptomycin

**ATTENUATION OF COGNITIVE IMPAIRMENT BY THE NONBACTERIOLYTIC
ANTIBIOTIC DAPTOMYCIN IN WISTAR RATS SUBMITTED TO
PNEUMOCOCCAL MENINGITIS**

Tatiana Barichello¹; João Carlos Nepomuceno Gonçalves¹, Jaqueline S. Generoso¹,
Graziele Milioli¹, Cintia Silvestre¹, Caroline S. Costa¹, Jaqueline da Rosa Coelho¹,
Clarissa M. Comim², João Quevedo²

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

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

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

Background: *Streptococcus pneumoniae* is associated with neurologic sequels, such as, seizures, sensory-motor deficits, hearing loss, learning and memory impairment, which can occur in approximately 30 to 52% of surviving patients. Neuronal damage can be caused by intense inflammatory reaction and direct effects of the bacteria virulence factors. The aim of the present study was to evaluate the effects of the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin versus ceftriaxone on behavioral parameters in adult Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis.

Methods: The animals underwent a magna cistern tap receiving either 10 μ l sterile saline as a placebo or an equivalent volume of a *S. pneumoniae* suspension at the concentration of 5×10^9 cfu/mL and they were randomized into different groups: sham (placebo); meningitis with ceftriaxone treatment (100 mg/kg during 7 days) and meningitis with daptomycin treatment (50 mg/kg, during 7 days). Ten days after meningitis induction the animals were submitted to four behavioral tasks: habituation to an open field, step-down inhibitory avoidance, continuous multiple-trials step-down inhibitory avoidance task and object recognition.

Results: Ten days after induction we verified that the meningitis group with daptomycin treatment showed retention of aversive memory; it presented memory of the object recognition at short term and long term. In continuous multiple-trials step-down inhibitory avoidance task the meningitis group with ceftriaxone treatment required approximately two times more stimulus to reach the acquisition criterion when compared with meningitis group with daptomycin treatment. However, in habituation memory there were no differences in the number of crossings and rearings in training and task sessions demonstrating habituation impairment to the environment task in both meningitis groups.

Conclusions: The evidence of the present study shows the potential alternative of the treatment with daptomycin in preventing learning and memory impairments caused by pneumococcal meningitis. Further investigations are necessary to provide support for evaluation of daptomycin as an alternative treatment of bacterial meningitis.

Key-words: *Streptococcus pneumoniae*; meningitis; behavior; memory; daptomycin.

1. INTRODUCTION

Pneumococcal meningitis is a life-threatening disease associated with high mortality and morbidity rates. *Streptococcus pneumoniae* meningitis mortality ranges from 16 to 37% and it is associated with neurologic sequels, such as, seizures, sensory-motor deficits, hearing loss, learning and memory impairment, which can occur in approximately 30 to 52% of surviving patients [1-5].

This microorganism can multiply within the cerebrospinal fluid (CSF) and it leads to the release of bacterial components, which stimulates the production of cytokines and other pro-inflammatory molecules in response to bacterial stimuli [6]. As consequence, polymorphonuclear are attracted, activated and released in large amounts of superoxide anion and nitric oxide, leading to oxidative stress. This cascade leads to mitochondrial damage and blood-brain barrier breakdown. Both damages contribute to cell injury during pneumococcal meningitis. The immune response in cerebrospinal fluid has shown to play a key role in this pathophysiology, principally to the development of the brain damage [7]. Neuronal damage can be caused by intense inflammatory reaction and by direct effects of the bacteria virulence factors [8]. The hippocampus is surrounded by interstitial fluid which is contiguous with the CSF, allowing bacterial toxins and pro-inflammatory mediators to propagate into the parenchyma [9].

A nonbacteriolytic antibiotic but with high bactericidal properties would minimize the cognitive damage. Since, during the treatment with bacteriolytic antibiotics it could contribute to increase inflammation in the subarachnoid space also through the release of bacterial components[10]. Daptomicyn is an antibacterial agent active against Gram-positive bacteria [11]. The bactericidal activity occurs by

irreversible binding within the bacterial cell membrane in a calcium-dependent process. This leads to depolarization of the cell membrane and inhibition of the RNA, DNA and protein synthesis, which results in rapid bacterial cell death without triggering immediate cell lysis [12]. Thus, in experimental pneumococcal meningitis it has been demonstrated that daptomicin produces an enhanced bactericidal activity [13]; it attenuates the CSF inflammation [14] and also prevented cortical brain injury when compared to ceftriaxone treatment [15].

In this context, the aim of the present study was to evaluate the effects of the nonbacteriolytic antibiotic daptomicin versus ceftriaxone on behavioral parameters in adult Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Infecting organism

S. pneumoniae (serotype 3) was cultured overnight in 10 ml of Todd Hewitt broth, diluted in fresh medium and grown to logarithmic phase. This culture was centrifuged for 10 min at (5,000×g) and resuspended in sterile saline to the concentration of 5×10^9 cfu/mL. The size of the inoculum was confirmed by quantitative cultures [16, 17].

2.2. Animal model of meningitis

Adult male Wistar rats (250-350 g body weight), from our breeding colony were used for the experiments. All procedures were approved by the Animal Care and Experimentation Committee of UNESC, Brazil, under protocol 72/2012 and followed in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised in 1996. All surgical procedures and bacterial inoculations were performed under anesthesia, consisting of an intraperitoneal administration of ketamine (6.6 mg/kg), xylazine (0.3 mg/kg), and acepromazine (0.16 mg/kg) [18]. Rats underwent a cisterna magna tap with a 23-gauge needle. The animals received either 10 µl of sterile saline as a placebo or an equivalent volume of *S. pneumoniae* suspension. At the time of inoculation, animals received fluid replacement and were subsequently returned to their cages [19, 20]. Eighteen hours later, the meningitis was documented by a quantitative culture of 5 µl of CSF obtained by puncture of the cisterna magna [16]. Therefore, animals were randomly chosen to receive daptomycin, Cubicin® (50 mg/kg body weight, administered subcutaneously [s.c.]) or ceftriaxone (100 mg/kg body weight given s.c.), during 7 days).

After 10 days, the animals were free from infection. We performed blood cultures that were all negative in this period. Thus, the animals were separately undergone to four behavioral tasks: a) open field; b) object recognition; c) step-down inhibitory avoidance task (single-training) and d) continuous multiple-trials step-down inhibitory avoidance task.

2.3. Behavioral tasks

The animals separately underwent to four behavioral tasks: habituation to an open field, step-down inhibitory avoidance task, continuous multiple-trials step-down inhibitory avoidance task and object recognition. All behavioral procedures were conducted between 01 and 04 p.m. in a sound-isolated room, and each animal performed only one behavior test. All behavioral tests were recorded by the same person who was blind to the animal group.

2.3.1. Open field test

The behavior was assessed in the open field apparatus in order to evaluate both locomotor and exploratory activities. The apparatus is a 40 cm × 60 cm open field surrounded by 50 cm high walls made of brown plywood with a frontal glasswall. The floor of the open field is divided into 9 rectangles by black lines. The animals were gently placed on the left rear quadrant and then left alone to explore the arena for 5 min (training session). Immediately after this procedure, the animals were taken back to their home cage and 24 h later they were submitted again to a similar open-field session (test session). Every cross of the black lines and rearing performed in both sessions were counted for 5 min. The decrease in the number of crossings and rearings between the two sessions was taken as a measure of the retention of habituation memory [21].

2.3.2. Object recognition

This task evaluates the non-aversive and non-spatial memory. The apparatus and procedures for the object recognition task have been described elsewhere [22]. Briefly, the task took place in a 40 x 50 cm open field surrounded by 50 cm high walls made of plywood with a frontal glass wall. The floor of the open field was divided into 12 equal rectangles by black lines. All animals were submitted to a habituation session where they were allowed to freely explore the open field for 5 min. No objects were placed in the box during the habituation trial. The total number of crossings of the black lines and rearings performed in this session were evaluated as locomotor and exploratory activity, respectively. The training was conducted by placing individual rats for 5 min in the field, in which two identical objects (objects A1 and A2, both being cubes) were positioned in two adjacent corners, 10 cm from the walls. In a short-term recognition memory test given 1.5 h after training, the rats explored the open field for 5 min in the presence of one familiar (A) and one novel (B, a pyramid with a square-shaped base) object. All objects had similar textures (smooth), colors (blue), and sizes (weight 150-200 g), but distinctive shapes. A recognition index calculated for each animal is reported as the ratio $TB/(TA + TB)$ (TA = time spent exploring the familiar object A; TB = time spent exploring the novel object B). In a long-term recognition memory test given 24 h after training, the same rats were allowed to explore the field for 5 min in the presence of the familiar object A and a novel object C (a sphere with a square shaped base). Recognition memory was evaluated as done for the short-term memory test. Exploration was defined as sniffing (exploring the object 3-5 cm away from it) or touching the object with the nose and/or forepaws.

2.3.3. Step-down inhibitory avoidance task

This task evaluates aversive memory. The apparatus and procedures have been described in previous reports [23, 24]. Briefly, the training apparatus was a 50 x 25 x 25 cm acrylic box (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) which the floor was consisted of parallel caliber stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart from each other. A 7 cm-wide, 2.5 cm-high platform was placed on the floor of the box against the left wall. In the training trial, animals were placed on the platform and their latency to step down on the grid with all four paws was measured with an automatic device. Immediately after stepping down on the grid, the animals received a 0.4 mA, 2.0 s foot shock and returned to their home cage. A retention test trial was performed 24 h after training (long-term memory). The retention test trial was procedurally identical to the training, except that no foot shock was presented. The retention test step-down latency (maximum, 180 s) was used as a measure of inhibitory avoidance retention. Reactivity to the foot shock was evaluated in the same apparatus used for inhibitory avoidance, except that the platform was removed. Each animal was placed on the grid and allowed 1 min for habituation period prior to the start of a series of shocks (0.5 s) delivered at 10 s intervals. The shock intensities ranged from 0.1 to 0.5 mA in 0.1 mA increments. The adjustments in the shock intensity were made in accordance to each animal's response. The intensity was raised by 1 unit when no response occurred and lowered by 1 unit when a response was made. A "flinch" response was defined as the withdrawal of one paw from the grid floor, and a "jump" response was defined as rapid withdrawal of three or four paws. Two measurements of the "flinch" threshold were made and then two measurements of the "jump" threshold were made. For each animal the mean of the two scores for the flinch and the jump thresholds were calculated [25, 26].

2.3.4. Continuous multiple-trials step-down inhibitory avoidance task

This task evaluates aversive memory in the test section and learning when analyzing the number of training trials required for the acquisition criterion (see below). It was performed in the same step-down inhibitory avoidance apparatus; however, in the training session, the animal was placed on the platform and immediately after stepping down on the grid, received a 0.3 mA, 2.0 s foot shock. This procedure continued until the rat remained on the platform for 50 s. The animal was then returned to the home cage. The number of training trials required to reach the acquisition criterion of 50 s on the platform was recorded. The retention test was performed 24 h later (long-term memory) [27].

2.4 Statistics

Data from the habituation to an open field task is reported as mean \pm SEM, and it was analyzed by the paired Student's t test and ANOVA post-hoc Tukey. Data from the object recognition task and inhibitory avoidance task are reported as median and interquartile ranges, and comparisons among groups were performed using Mann-Whitney U tests. The within-individual groups were analyzed by Wilcoxon's tests. Data from continuous multiple-trials step-down inhibitory avoidance task the trials were reported as mean \pm SD, and were analyzed by the ANOVA post-hoc Tukey. Data from the latency time was reported as median and interquartile ranges, and comparisons among groups were performed using Mann-Whitney U tests. In all comparisons, $p < 0.05$ indicated statistical significance.

3. RESULTS

In the open-field task, figure 1, there were no differences in the number of crossings and rearings among groups in the habituation to the open-field training session ($p > 0.05$) demonstrating no difference in motor and exploratory activity among groups. In the sham group, there was statistical difference between training and test session (crossing $t = 9.161$, $df = 9$, $p = 0.0001$; rearings $t = 10.672$, $df = 9$, $p = 0.0001$) demonstrating habituation memory.

In the meningitis/ceftriaxone group (crossing $t = 1.929$, $df = 9$, $p = 0.086$; rearings $t = 0.949$, $df = 9$, $p = 0.369$) and the meningitis/daptomycin group (crossing $t = 2.195$, $df = 9$, $p = 0.056$; rearings $t = 0.884$, $df = 9$, $p = 0.400$) there were no differences between training session and test session suggesting memory impairment in both groups.

The object recognition task in figure 2, the animals of meningitis/ceftriaxone group presented impairment of novel object recognition memory, i.e., they did not spend a significantly greater time exploring the novel object, presenting memory impairment during short term ($Z = -0.866$, $p = 0.386$) and long term memory ($Z = -0.051$, $p = 0.959$). However, the animals of meningitis/daptomycin group did not present memory impairments during short term ($Z = -2.499$, $p = 0.012$) and long term ($Z = -2.395$, $p = 0.017$) retention test sessions in comparison to the training trial.

Figure 3, the step-down latency. In the training session there was not significant difference in the latency time among the groups ($p > 0.05$). In the meningitis/ceftriaxone group there wasn't difference in the latency time between training and test ($Z = -1.703$; $p = 0.089$) presenting memory impairment. In the meningitis/daptomycin group there was difference between training and test session ($Z = -2.810$; $p = 0.005$) demonstrating aversive memory in this group.

Figure 4, continuous multiple trials step-down inhibitory avoidance. We demonstrated a significant increase in the number of training trials ($t = 3.536$, $df = 18.541$, $p = 0.002$) required to reach the acquisition criterion (50 s on the platform) in the meningitis/ceftriaxone group when compared to the sham group, figure 4 A. The results of this task suggest that the meningitis/ceftriaxone group required approximately two times more stimulus to reach the acquisition criterion when compared with the sham group and with meningitis/daptomycin group. Meningitis/ceftriaxone group had learning and impairment memory. In the retention test, there was no difference among groups for all the times tested, figure 4 B.

4. DISCUSSION

In spite of significant advances in pneumococcal meningitis treatment, it remains one of the most important worldwide infectious diseases and it is still correlated with elevated mortality and morbidity. Moreover, a large number of survivors present permanent neurological sequelae [5, 6].

The present study suggests a beneficial effect of therapy with daptomycin on memory and learning in an animal model of pneumococcal meningitis. In the habituation memory there was no difference between treatments with daptomycin and ceftriaxone, both groups demonstrated impairments in this memory. However, the meningitis group with daptomycin treatment showed retention of aversive memory and the animals also presented memory of the object recognition at short term and long term. In continuous multiple-trials step-down inhibitory avoidance task, the meningitis group with ceftriaxone treatment required approximately two times more stimulus to reach the acquisition criterion when compared with meningitis group with daptomycin treatment.

Several studies with daptomycin treatment on experimental pneumococcal meningitis with favorable results have been reported. Daptomycin cleared the bacteria more efficiently from the CSF than ceftriaxone; decreased the inflammatory host response, as assessed by the matrix metalloproteinase-9, IL-1 β , IL-10, IL-18, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1alpha) in CSF and prevented the development of cortical injury [16, 28]. During bacterial multiplication into the CSF, it released products that are highly immunogenic and can lead to an increased of the host immune response [10, 16]. Whereas, in experimental pneumococcal meningitis model the animals presented in the first twenty four hours elevated levels of TNF- α and CINC-1 in the hippocampus and TNF- α , IL-1 β , IL-6 and CINC-1 in frontal cortex[29]. Furthermore, the host

inflammatory response can be exacerbated by the effects of bacteriolytic antibiotics [30]. The release of teichoic acids (TAs) and lipoteichoic acids (LTAs) from *S. pneumoniae* showed intense during exposure to ceftriaxone and meropenem [31].

Daptomycin is an antibacterial agent and nonbacteriolytic active against the main Gram-positive pathogens [11, 32], including penicillin and cephalosporin resistant pneumococci [33]. Daptomycin was highly efficacious against penicillin-resistant and quinolone-resistant pneumococci [34], in addition, ceftriaxone with adjunctive daptomycin treatment attenuates brain damage and hearing loss more efficiently than rifampin in infant rat induced by pneumococcal meningitis [35]. When the bacteria are killed without lyses, it provides the advantage by reducing the release of bacterial molecules, such as, TAs, LTAs, peptidoglycan and bacterial DNA [36]. These effects could be an explanation for the observation that daptomycin prevented the development of cortical brain injury in experimental pneumococcal meningitis [16] and prevented memory impairment in our study. Previous studies demonstrated 10 days after pneumococcal meningitis induction that animals treated with ceftriaxone it presented memory and learning deficits, anxiety-like and depressive-like behavior [37].

The evidence of the present study suggests the potential alternative of the treatment with daptomycin in preventing learning and memory impairments caused by pneumococcal meningitis. Further investigations are necessary to provide support for evaluation of daptomycin as an alternative treatment of bacterial meningitis.

ABBREVIATIONS

cfu: colony-forming units;
CINC-1: cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1;
CSF: cerebral spinal fluid;
IL-1 β : interleukin-1 betha;
IL-6: interleukin-6;
LTAs: lipoteichoic acids;
S. pneumoniae: *Streptococcus pneumoniae*;
TAs: teichoic acids;
TNF- α : tumor necrosis factor-alpha.

Acknowledgements

This research was supported by grants from CNPq, FAPESC, UNESC, NENASC project (PRONEX program CNPq/FAPESC), INCT-TM, Research Support Center on Applied Neuroscience (NAPNA-USP, 2011.1.9333.1.3) and L'Oréal-UNESCO Brazil Fellowship for Women in Science 2011.

Disclosure

The authors have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Kastenbauer S, Pfister HW: **Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases.** *Brain : a journal of neurology* 2003, **126**(Pt 5):1015-1025.
2. van de Beek D, de Gans J: **Meningitis-associated hearing loss: protection by adjunctive antioxidant therapy.** *Annals of neurology* 2004, **55**(4):597-598; author reply 598.
3. Grimwood K, Anderson P, Anderson V, Tan L, Nolan T: **Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects.** *Archives of disease in childhood* 2000, **83**(2):111-116.
4. Hoogman M, van de Beek D, Weisfelt M, de Gans J, Schmand B: **Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis.** *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2007, **78**(10):1092-1096.
5. Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, van de Beek D: **Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis.** *Clinical microbiology reviews* 2011, **24**(3):557-591.
6. Sellner J, Tauber MG, Leib SL: **Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections.** *Handb Clin Neurol* 2010, **96**:1-16.
7. Gerber P, Stucki A, Acosta F, Cottagnoud M, Cottagnoud P: **Daptomycin is more efficacious than vancomycin against a methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in experimental meningitis.** *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2006, **57**(4):720-723.
8. Rennels ML, Gregory TF, Blaumanis OR, Fujimoto K, Grady PA: **Evidence for a 'paravascular' fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer protein throughout the brain from the subarachnoid space.** *Brain research* 1985, **326**(1):47-63.
9. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A: **The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall.** *The Journal of infectious diseases* 1985, **151**(5):859-868.
10. Meli DN, Christen S, Leib SL, Tauber MG: **Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*.** *Current opinion in infectious diseases* 2002, **15**(3):253-257.
11. Anastasiou DM, Thorne GM, Luperchio SA, Alder JD: **In vitro activity of daptomycin against clinical isolates with reduced susceptibilities to linezolid and quinupristin/dalfopristin.** *International journal of antimicrobial agents* 2006, **28**(5):385-388.

12. Silverman JA, Perlmutter NG, Shapiro HM: **Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus***. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**(8):2538-2544.
13. Stucki A, Cottagnoud M, Winkelmann V, Schaffner T, Cottagnoud P: **Daptomycin produces an enhanced bactericidal activity compared to ceftriaxone, measured by [3H]choline release in the cerebrospinal fluid, in experimental meningitis due to a penicillin-resistant pneumococcal strain without lysing its cell wall**. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(6):2249-2252.
14. Grandgirard D, Leib SL: **Meningitis in Neonates: Bench to Bedside**. *Clinics in Perinatology* 2010, **37**(3):655-676.
15. Grandgirard D, Steiner O, Tauber MG, Leib SL: **An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis**. *Acta neuropathologica* 2007, **114**(6):609-617.
16. Grandgirard D, Schurch C, Cottagnoud P, Leib SL: **Prevention of brain injury by the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin in experimental pneumococcal meningitis**. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(6):2173-2178.
17. Barichello T, Dos Santos I, Savi GD, Simoes LR, Generoso JS, Comim CM, Sachs D, Teixeira AL, Quevedo J: **Depressive-like-behavior and proinflammatory interleukine levels in the brain of rats submitted to pneumococcal meningitis**. *Brain research bulletin* 2010, **82**(5-6):243-246.
18. Barichello T, dos Santos I, Savi GD, Florentino AF, Silvestre C, Comim CM, Feier G, Sachs D, Teixeira MM, Teixeira AL et al: **Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) levels in the brain and cerebrospinal fluid after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae***. *Neurosci Lett* 2009, **467**(3):217-219.
19. Irazuzta JE, Pretzlaff RK, Zingarelli B, Xue V, Zemlan F: **Modulation of nuclear factor-kappaB activation and decreased markers of neurological injury associated with hypothermic therapy in experimental bacterial meningitis**. *Crit Care Med* 2002, **30**(11):2553-2559.
20. Irazuzta J, Pretzlaff RK, Zingarelli B: **Caspases inhibition decreases neurological sequelae in meningitis**. *Crit Care Med* 2008, **36**(5):1603-1606.
21. Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I: **Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat**. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* 2000, **7**(5):333-340.
22. de Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schroder N: **Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats**. *Behavioural brain research* 2005, **156**(1):139-143.

23. Quevedo J, Vianna M, Zanatta MS, Roesler R, Izquierdo I, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA: **Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory.** *Behav Pharmacol* 1997, **8**(8):713-717.
24. Roesler R, Schroder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MB: **Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats.** *Brain research* 2003, **975**(1-2):207-213.
25. Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH: **Mechanisms for memory types differ.** *Nature* 1998, **393**(6686):635-636.
26. Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M: **Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task.** *The European journal of neuroscience* 2003, **17**(4):897-902.
27. Roesler R, Vianna MR, de-Paris F, Quevedo J: **Memory-enhancing treatments do not reverse the impairment of inhibitory avoidance retention induced by NMDA receptor blockade.** *Neurobiology of learning and memory* 1999, **72**(3):252-258.
28. Grandgirard D, Oberson K, Buhlmann A, Gaumann R, Leib SL: **Attenuation of Cerebrospinal Fluid Inflammation by the Nonbacteriolytic Antibiotic Daptomycin versus That by Ceftriaxone in Experimental Pneumococcal Meningitis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010, **54**(3):1323-1326.
29. Stuertz K, Schmidt H, Trostdorf F, Eiffert H, Mader M, Nau R: **Lower lipoteichoic and teichoic acid CSF concentrations during treatment of pneumococcal meningitis with non-bacteriolytic antibiotics than with ceftriaxone.** *Scandinavian journal of infectious diseases* 1999, **31**(4):367-370.
30. Barichello T, Generoso JS, Collodel A, Moreira AP, Almeida SM: **Pathophysiology of acute meningitis caused by Streptococcus pneumoniae and adjunctive therapy approaches.** *Arquivos de neuro-psiquiatria* 2012, **70**(5):366-372.
31. Barichello T, dos Santos I, Savi GD, Simoes LR, Silvestre T, Comim CM, Sachs D, Teixeira MM, Teixeira AL, Quevedo J: **TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by Streptococcus pneumoniae.** *Journal of neuroimmunology* 2010, **221**(1-2):42-45.
32. Tally FP, Zeckel M, Wasilewski MM, Carini C, Berman CL, Drusano GL, Oleson FB, Jr.: **Daptomycin: a novel agent for Gram-positive infections.** *Expert opinion on investigational drugs* 1999, **8**(8):1223-1238.
33. Carpenter CF, Chambers HF: **Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens.** *Clinical*

infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2004, **38**(7):994-1000.

34. Cottagnoud P, Pfister M, Acosta F, Cottagnoud M, Flatz L, Kuhn F, Muller HP, Stucki A: **Daptomycin is highly efficacious against penicillin-resistant and penicillin- and quinolone-resistant pneumococci in experimental meningitis.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**(10):3928-3933.
35. Grandgirard D, Burri M, Agyeman P, Leib SL: **Adjunctive daptomycin attenuates brain damage and hearing loss more efficiently than rifampin in infant rat pneumococcal meningitis.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012, **56**(8):4289-4295.
36. Nau R, Eiffert H: **Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis.** *Clinical microbiology reviews* 2002, **15**(1):95-110.
37. Barichello T, Silva GZ, Generoso JS, Savi GD, Michelon CM, Feier G, Comim CM, Quevedo J: **Time-dependent behavioral recovery after pneumococcal meningitis in rats.** *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 2010, **117**(7):819-826.

Figure 1. Open field test 10 days after induction of meningitis by *S. pneumoniae*. Data are reported as mean \pm SEM. n=10 per group, and were analyzed by the paired Student's t test and ANOVA post-hoc Tukey. * $p < 0.05$ vs. Training.

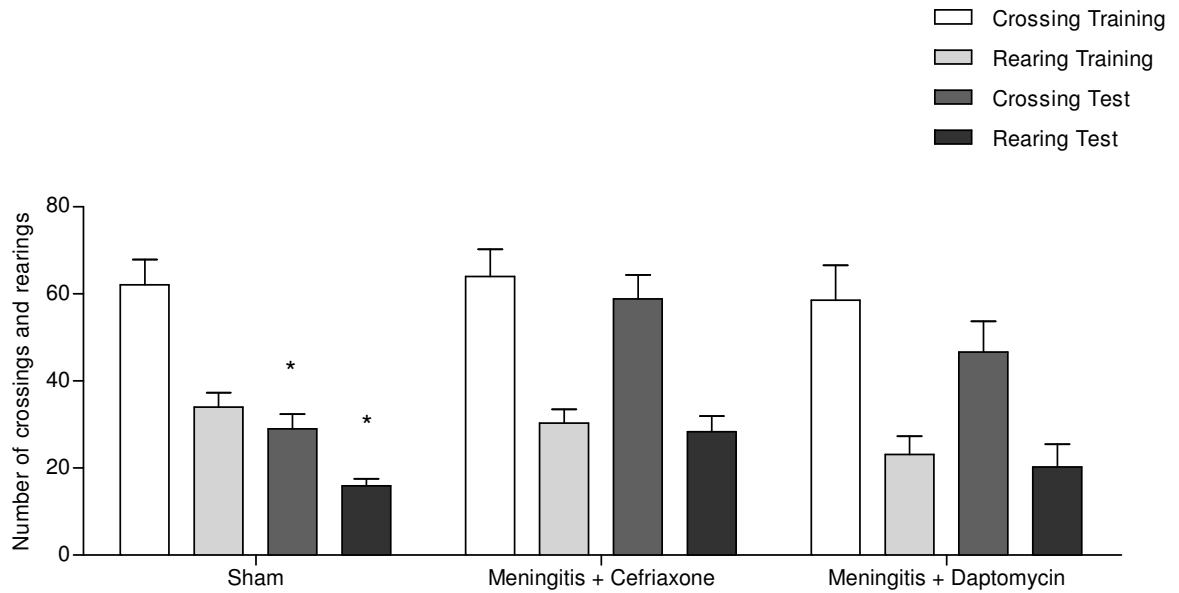


Figure 2. Object recognition task 10 days after induction of meningitis by *S. pneumoniae*. The short-term recognition memory the test is evaluated at 1.5 h after training (STM) and the long-term recognition memory the test is evaluated at 24 h after training (LTM). Data are reported as median and interquartile ranges, and comparisons among groups were performed using Mann–Whitney U tests, $n=10$ per group. The within-individual groups were analyzed by Wilcoxon's tests. * $p<0.05$ test vs. training.

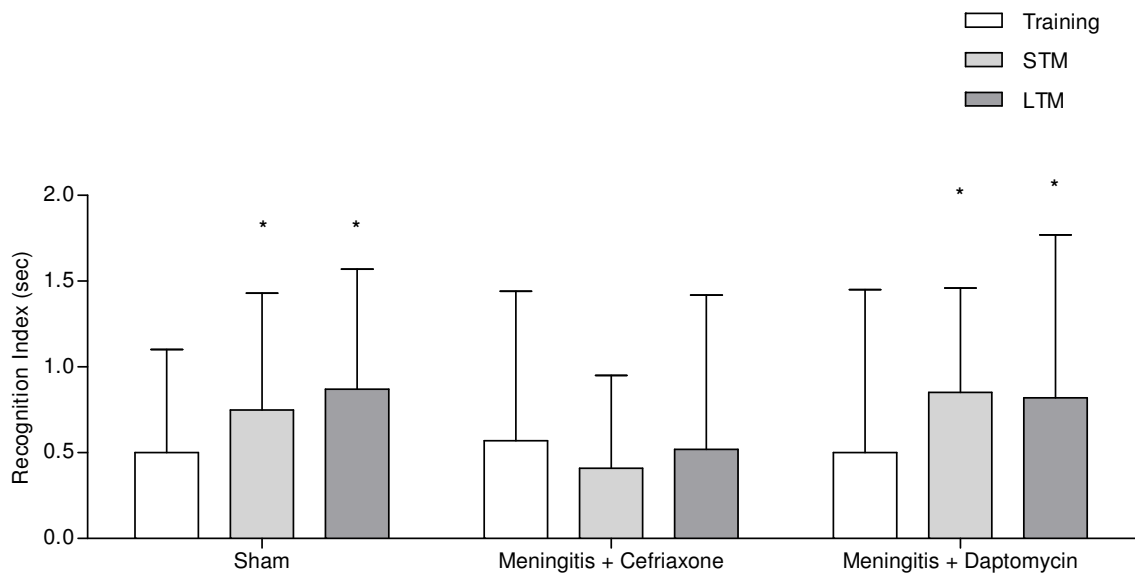


Figure 3. Latency to step-down in the inhibitory avoidance task 10 days after induction of meningitis by *S. pneumoniae*. Data are reported as median and interquartile ranges, and comparisons among groups were performed using Mann–Whitney U tests, n=10 per group. The within-individual groups were analyzed by Wilcoxon’s tests. * $p < 0.05$ vs. training.

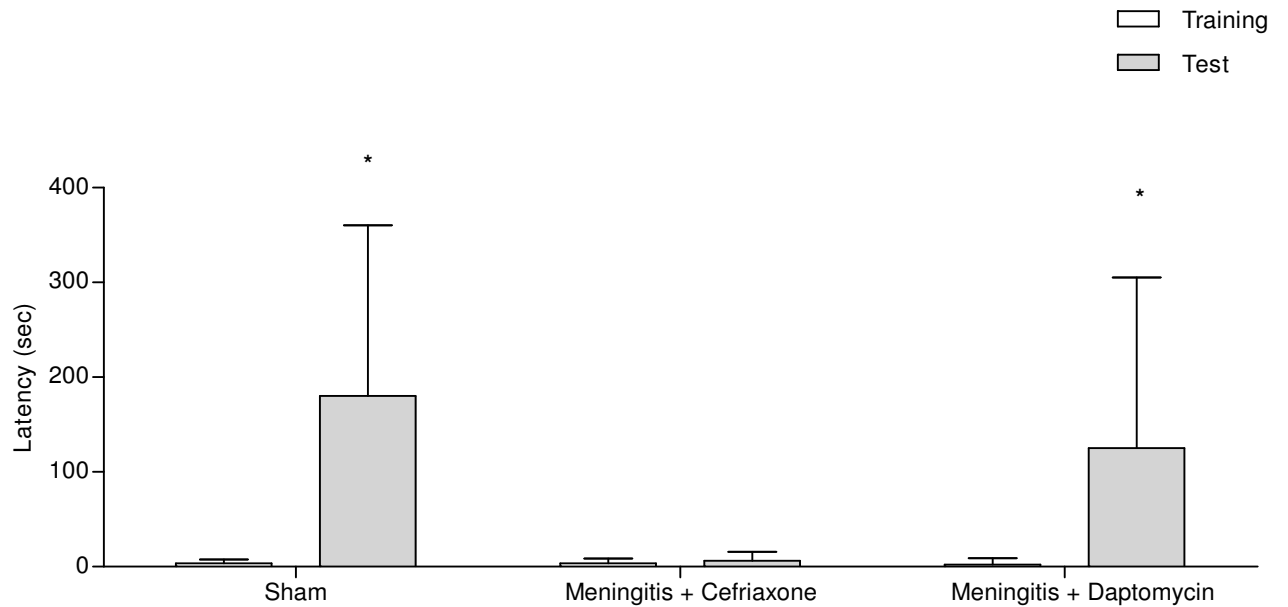
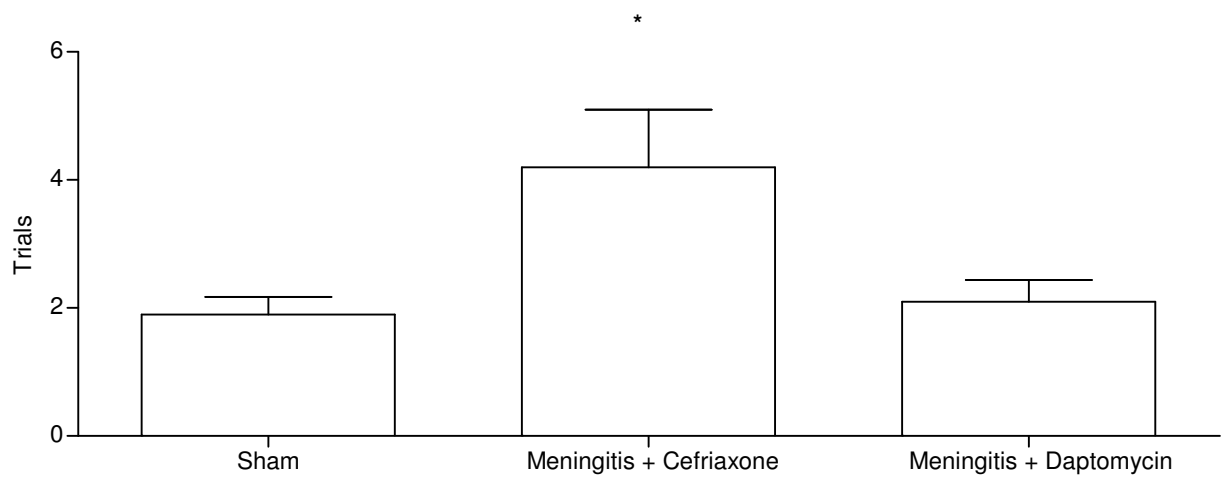
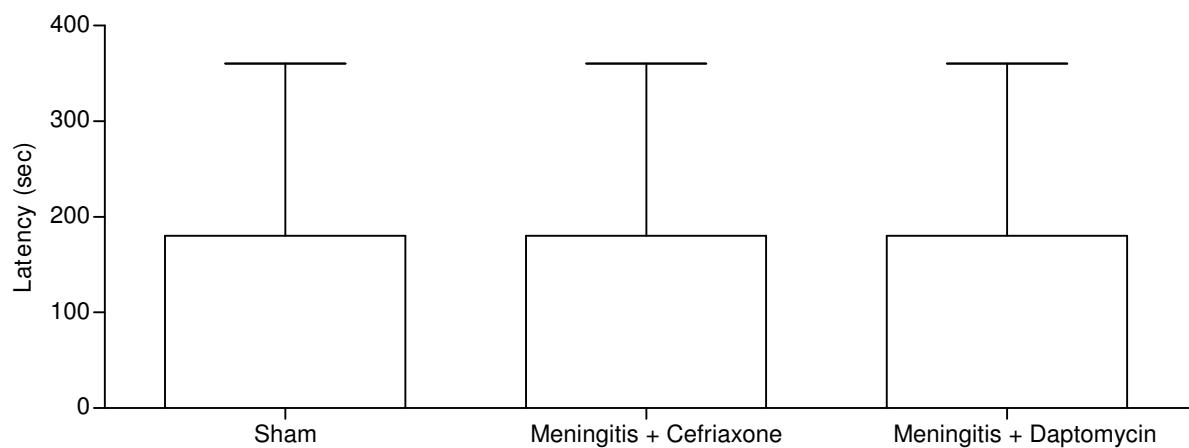


Figure 4. Continuous multiple trials step-down inhibitory avoidance task 10 days after induction of meningitis by *S. pneumoniae*. Data from the trials is reported as mean \pm SD, and were analyzed by the ANOVA post-hoc Tukey, $n=10$ per group, figure 4 A. * $p<0.05$ vs. Sham. Data from the latency time is reported as median and interquartile ranges, and comparisons among groups were performed by Wilcoxon's tests, figure 4 B. * $p<0.05$ vs. Sham.

4 A



4 B



**PARTE II – TRADUÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO ELABORADO NA DISCIPLINA
DE TCC II**

**ATENUAÇÃO DO COMPROMETIMENTO COGNITIVO PELO ANTIBIÓTICO NÃO-
BACTERIOLÍTICO DAPTOMICINA EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À
MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

Tatiana Barichello¹; João Carlos Nepomuceno Gonçalves¹, Jaqueline S. Generoso¹,
Graziele Milioli¹, Cintia Silvestre¹, Caroline S. Costa¹, Jaqueline da Rosa Coelho¹,
Clarissa M. Comim², João Quevedo²

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

²Laboratório de Neurociências e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Programa de Pós-Graduação em 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, Brasil. Fax: #55 48 3443 4817. E-mail: tba@unesc.net

RESUMO

Introdução: *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria Gram-positiva que está associada com sequelas neurológicas, tais como convulsões, déficit sensório-motor, perda de audição, dificuldade de aprendizagem e perda de memória, que pode ocorrer em cerca de 30 a 52% dos pacientes sobreviventes. Danos neuronais podem ser causados pela reação inflamatória intensa e os efeitos diretos dos fatores de virulência das bactérias. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do antibiótico não-bacteriolítico daptomicina em comparação com a ceftriaxona através de parâmetros comportamentais em ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica.

Métodos: Os animais receberam, diretamente na cisterna magna, 10 µL de soro fisiológico estéril como placebo ou o volume equivalente de uma suspensão de *S. pneumoniae*, na concentração de 5×10^9 UFCol/mL e foram randomizados em diferentes grupos: sham (controle); meningite tratado com ceftriaxona (100 mg/kg durante 7 dias) e meningite tratado com daptomicina (50 mg/kg, durante 7 dias). Dez dias após a indução da meningite, os animais foram submetidos a quatro testes comportamentais: habituação ao campo aberto, esQUIVA inibitória, esQUIVA inibitória de treinos contínuos e memória de reconhecimento de objetos.

Resultados: Dez dias após a indução verificou-se que o grupo meningite tratado com daptomicina apresentou retenção de memória aversiva e memória de reconhecimento de objetos em curto e longo prazo. Na esQUIVA inibitória de treinos contínuos, o grupo meningite tratado com ceftriaxona necessitou cerca de duas vezes mais estímulo para atingir o critério de aquisição, quando comparado com o grupo tratado com daptomicina. No entanto, no teste de memória de habituação não houve diferença significativa no número de cruzamentos e levantamentos nas sessões teste e treino, demonstrando comprometimento na tarefa de habituação ao campo aberto, em ambos os grupos de meningite.

Conclusões: O presente estudo evidencia uma potencial alternativa do tratamento com daptomicina na prevenção de deficiências de aprendizado e memória causadas pela meningite pneumocócica. Outras investigações são necessárias para fornecer suporte para a avaliação da daptomicina como um tratamento alternativo da meningite bacteriana.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*; meningite; comportamento; memória; daptomicina.

1. INTRODUÇÃO

A meningite pneumocócica é uma doença grave associada com alta mortalidade e morbidade. A taxa de mortalidade da meningite pelo *Streptococcus pneumoniae* varia entre 16-37% e está associada com sequelas neurológicas, tais como convulsões, déficits sensório-motores, perda auditiva, dificuldade de aprendizagem e perda de memória, que pode ocorrer em cerca de 30 a 52% dos pacientes sobreviventes [1 -5].

S. pneumoniae é um microorganismo que, quando atravessa a barreira hematoencefálica, pode multiplicar-se dentro do líquido cefalorraquidiano (LCR), gerando a liberação de componentes bacterianos, que estimulam a produção de citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias em resposta a estímulos bacterianos [6]. Como consequência, polimorfonucleares são atraídos, ativados e liberam grandes quantidades de ânion superóxido e óxido nítrico, levando ao estresse oxidativo. Esta cascata induz a lesão mitocondrial e a ruptura da barreira hematoencefálica. Ambos os danos contribuem para a lesão da célula durante a meningite pneumocócica. A resposta imune do hospedeiro no LCR revelou desempenhar um papel chave na fisiopatologia da meningite, principalmente para o desenvolvimento da lesão cerebral [7]. Os danos neuronais podem ser causados pela reação inflamatória intensa e pelos efeitos diretos dos fatores de virulência das bactérias [8]. O hipocampo é circundado por fluido intersticial, que é contíguo ao LCR, permitindo que as toxinas bacterianas e mediadores pró-inflamatórios propaguem-se para o parênquima cerebral [9].

Um antibiótico não-bacteriolítico, mas com elevadas propriedades bactericidas poderia minimizar o dano cognitivo, uma vez que durante o tratamento com medicamentos bacteriolíticos pode-se contribuir para aumentar a inflamação no espaço subaracnóide através da liberação de componentes bacterianos

intracelulares [10]. Daptomicina é um agente antibacteriano ativo contra bactérias Gram-positivas [11]. A atividade bactericida ocorre por ligação irreversível no interior da membrana celular bacteriana, num processo dependente de cálcio. Isto leva a despolarização da membrana celular e a inibição do RNA, DNA e síntese de proteína, o que resulta numa rápida morte da célula bacteriana, sem desencadear a lise celular imediata [12]. A daptomicina demonstrou produzir uma atividade bacteriana melhorada no tratamento da meningite pneumocócica experimental [13], atenuando a inflamação no LCR [14] e impedindo lesão cerebral cortical quando comparado com o tratamento com ceftriaxona [15].

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do antibiótico não bacteriolítico daptomicina em comparação com a ceftriaxona em parâmetros comportamentais em ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Organismo infectante

S. pneumoniae (sorotipo 3), foi cultivado durante a noite em 10 ml de caldo Todd Hewitt, diluído em meio fresco e cultivado até à fase logarítmica. Esta cultura foi centrifugada durante 10 minutos a (5000 x g) e novamente suspensa em solução salina estéril até a concentração de 5×10^9 UFCol/mL. O tamanho do inóculo foi confirmado por cultura quantitativa [16,17].

2.2. Modelo animal de meningite

Ratos Wistar machos (250-350 g de peso corporal), provenientes da nossa colônia no biotério foram utilizados para os experimentos. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNESC, Brasil, sob o número de protocolo 72/2012 e seguido de acordo com o Instituto Nacional de Guia de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NIH Publicações No. 80-23), revista em 1996. Todos os procedimentos cirúrgicos e inoculações bacterianas foram realizadas sob anestesia, composta de uma administração intraperitoneal de cetamina (6,6 mg/kg), xilazina (0,3 mg/kg) e acepromazina (0,16 mg/kg) [18]. Os ratos foram submetidos a uma punção na cisterna magna com uma agulha número 23. Os animais receberam 10 µL de solução salina estéril como um placebo ou um volume equivalente de suspensão bacteriana de *S. pneumoniae*. No momento da inoculação, os animais receberam reposição volêmica e foram subseqüentemente devolvidos às suas gaiolas [19,20]. Dezoito horas mais tarde, a meningite foi confirmada por uma cultura quantitativa de 5 µL de LCR obtido por punção da cisterna magna [16]. Por conseguinte, os animais foram aleatoriamente escolhidos para receber a daptomicina, Cubicin® (50 mg/kg, duas vezes ao dia, administrada

por via subcutânea [sc]) ou ceftriaxona (100 mg/kg, duas vezes ao dia, sc), durante 7 dias).

Após 10 dias, os animais estavam livres da infecção. Para demonstração da negatividade, foi realizada a cultura de sangue dos animais, através de punção do LCR. Os animais foram então submetidos aos testes comportamentais, divididos em 3 grupos: grupo 1 controle (n = 10); grupo 2 meningite + ceftriaxona (n = 10); grupo 3 meningite + daptomicina (n = 10). Foram utilizados 30 animais (10 de cada grupo), para cada teste comportamental (total de 4 testes), resultando em 120 animais para este estudo.

2.3 Testes comportamentais

Os animais foram submetidos separadamente a quatro testes comportamentais: habituação ao campo aberto, esquiva inibitória, esquiva inibitória de múltiplos treinos e memória de reconhecimento de objetos. Todos os procedimentos comportamentais foram conduzidos entre as 13 e 16 horas, numa sala isolada de som, onde cada animal realizou um único comportamento. Todos os testes comportamentais foram registrados pelo mesmo pesquisador, na condição de cego para o grupo animal.

2.3.1. Habituação ao campo aberto

O comportamento foi realizado no aparato de campo aberto, com a finalidade de avaliar as atividades locomotoras e exploratórias. O aparato mede 40 × 60 centímetros de diâmetro de campo aberto cercado por 50 centímetros de paredes feitas de madeira marrom com um vidro frontal. O piso do campo aberto é dividido em 9 retângulos por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante traseiro esquerdo e, em seguida, deixados sozinhos para explorar a arena

por 5 minutos (sessão treino). Imediatamente após este procedimento, os animais foram levados de volta para a sua gaiola e 24 horas mais tarde, eles foram submetidos a uma nova sessão no aparato de campo aberto (sessão de teste). Durante 5 minutos, em ambas as sessões, foram observadas e documentadas todas as vezes que o animal atravessava as linhas pretas demarcadas ou realizava atividade exploratória através de levantamentos. A diminuição do número de cruzamentos (*crossings*) e levantamentos (*rearings*) entre as duas sessões foi adotado como uma medida da retenção de memória de habituação [21].

2.3.2. Memória de reconhecimento de objetos

Esta tarefa avalia a memória não-aversiva e não-espacial. O aparato e os procedimentos para a tarefa de reconhecimento de objetos foram descritos por Lima e colaboradores, 2005 [22]. Resumidamente, a tarefa foi realizada em um campo de 40 x 50 centímetros aberto rodeado por paredes de 50 centímetros de altura feitas de madeira com uma parede de vidro frontal. O piso do campo aberto foi dividido em 12 retângulos iguais por linhas pretas. Todos os animais foram submetidos a uma sessão de habituação em que se permitiu explorar livremente o campo aberto durante 5 minutos. Nenhum objeto foi colocado na caixa durante o processo de habituação. O número total de cruzamentos das linhas pretas e levantamentos realizados nesta sessão foi avaliado respectivamente como locomoção e atividade exploratória. O treino foi realizado colocando os ratos individualmente durante 5 minutos no campo, em que dois objetos idênticos (objetos A1 e A2, ambos sendo cubos) foram posicionados em dois cantos adjacentes, a 10 cm de distância das paredes. No teste de memória de reconhecimento de curto prazo, dado 1,5 horas depois do treino, os ratos exploraram o campo aberto durante 5 minutos na presença de um objeto familiar (A) e um novo objeto (B, uma pirâmide com uma base

quadrada). Todos os objetos possuíam texturas semelhantes (lisas), cores (azul) e tamanhos (peso 150-200 g), mas formas distintas. Um índice de reconhecimento calculado para cada animal é relatado como a razão $TB/(TA + TB)$ (TA = tempo gasto explorando o objeto familiar A; TB = tempo gasto explorando o objeto B novo). No teste de memória de longo prazo, realizado 24 horas depois do treino, os mesmos ratos foram submetidos a uma nova exploração do campo, durante 5 minutos na presença do objeto familiar A e de um novo objeto C (uma esfera com uma base de formato quadrado). A memória de reconhecimento foi avaliada como no teste de memória de curto prazo. A exploração foi definida como *sniffing* (explorar o objeto 3-5 centímetros de distância a partir dele) ou tocar o objeto com o nariz e/ou patas dianteiras.

2.3.3. Esquiva inibitória

Este teste comportamental avalia a memória aversiva. O aparato e os processos foram descritos em estudos anteriores, por Quevedo (1997) e Roesler (2003) [23,24]. Resumidamente, o aparelho consiste em uma caixa de acrílico medindo 50 x 25 x 25 centímetros (Albarsch, Porto Alegre, Brasil), onde o piso é composto por barras paralelas de aço inoxidável (diâmetro de 1 mm) espaçadas em uma distância de 1 centímetro. Uma plataforma com 7 centímetros de largura e 2,5 centímetros de comprimento foi colocada junto à parede esquerda do aparato. Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo que os mesmos levaram para descer sobre as grades com as quatro patas foi medido com um dispositivo automático. Imediatamente após tocarem com as quatro patas na grade, os animais receberam um choque de 0,4 mA durante 2,0 segundos e voltaram à sua gaiola de origem. A sessão teste foi realizada 24 horas após o treinamento (memória de longo prazo). A sessão teste foi processualmente idêntica

à sessão treino, exceto que não foi distribuído nenhum choque nas patas dos animais. O tempo de latência ao teste de esquiva inibitória (máximo, 180 segundos) foi utilizado como uma medida de retenção da esquiva inibitória. A reatividade ao choque nas patas foi avaliada no mesmo aparato utilizado para a esquiva inibitória, exceto que a plataforma foi removida. Cada animal foi colocado sobre a grade, onde foi permitido um período de habituação de 1 minuto antes do início de uma série de choques (0,5 segundos) distribuídos em intervalos de 10 segundos. A intensidade dos choques variaram de 0,1 a 0,5 mA em incrementos de 0,1 mA. Os ajustes na intensidade dos choques foram feitos de acordo com a resposta de cada animal. A intensidade foi aumentada em 1 unidade, quando não ocorreu resposta e diminuída por um aparelho, quando a resposta foi observada. A resposta “*flinch*” foi definida como a retirada de uma pata do chão da grade e a resposta “*jump*” foi definida como a retirada rápida de três ou quatro patas. Duas medidas de “*flinch*” foram feitas e, em seguida, duas medidas de “*jump*” foram realizadas. Para cada animal, a média dos dois resultados para “*flinch*” e “*jump*” foi calculada [25,26].

2.3.4. Esquiva inibitória de múltiplos treinos

Este teste avalia a memória aversiva na seção de teste e a aprendizagem quando se analisa o número de treinos requeridos para a aquisição de critério (ver abaixo). Foi realizado no mesmo aparelho do teste de esquiva inibitória, no entanto, na sessão de treino, o animal foi colocado na plataforma, e imediatamente após descer da mesma e tocar a grade, recebeu um choque nas patas de 0.3 mA, durante 2.0 segundos. Este procedimento foi realizado até que o rato permanecesse na plataforma durante 50 segundos. O animal foi, em seguida, devolvido à gaiola. O número de treinos requeridos para atingir o critério de aquisição de 50 segundos

sobre a plataforma foi registrado. O teste de retenção de memória foi realizado 24 horas mais tarde (memória de longo prazo) [27].

2.4. Estatística

Dados da habituação ao campo aberto são dispostos como a média \pm EPM, e analisados por teste t de Student e ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. Dados do teste de reconhecimento de objetos e esQUIVA inibitória são relatados como faixas medianas e interquartis, e as comparações entre grupos foram realizadas utilizando testes de Mann-Whitney. As análises dentro dos grupos foram realizadas através de testes de Wilcoxon. Dados da esQUIVA inibitória de múltiplos treinos foram relatados como média \pm DP, e foram analisados pelo ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. Os dados do tempo de latência foram apresentados como faixas medianas e interquartis, e as comparações entre grupos foram realizadas utilizando testes de Mann-Whitney. Em todas as comparações, $p < 0,05$ indica significância estatística. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistical Package for the Social Science (SPSS), versão 16.0.

3. RESULTADOS

No teste de habituação ao campo aberto, figura 1, não houve diferença no número de cruzamentos e levantamentos entre os grupos na sessão de treino ($p > 0,05$), demonstrando não haver nenhuma diferença na atividade exploratória motora entre os grupos. No grupo controle, houve diferença estatística entre a sessão treino e a sessão teste (cruzamentos $t = 9.161$, $df = 9$, $p = 0,0001$; levantamentos $t = 10.672$, $df = 9$, $p = 0,0001$), demonstrando a retenção da memória de habituação.

No grupo meningite tratado com ceftriaxona (cruzamentos $t = 1.929$, $df = 9$, $p = 0,086$; levantamentos $t = 0.949$, $df = 9$, $p = 0,369$) e no grupo meningite tratado com daptomicina (cruzamentos $t = 2.195$, $df = 9$, $p = 0,056$; levantamentos $t = 0.884$, $df = 9$, $p = 0,400$), não houveram diferenças entre a sessão de treinamento e sessão de testes, sugerindo perda de memória em ambos os grupos.

Na tarefa de reconhecimento de objetos, figura 2, os animais do grupo meningite tratado com ceftriaxona apresentaram perturbações da memória de reconhecimento do objeto novo, ou seja, não dispuseram um tempo significativamente maior explorando o objeto novo, apresentando perda de memória de curto prazo ($Z = - 0.866$; $p = 0,386$) e memória de longo prazo ($Z = - 0.051$; $p = 0,959$). No entanto, os animais do grupo meningite tratado com daptomicina não apresentaram perda de memória de curto prazo ($Z = - 2.499$; $p = 0,012$) e de longo prazo ($Z = - 2.395$; $p = 0,017$) durante as sessões de teste em comparação com a sessão treino.

Na sessão treino da figura 3, esQUIVA inibitória, não houve diferença significativa entre o tempo de latência entre os grupos ($p > 0,05$). No grupo meningite tratado com ceftriaxona não houve diferença no tempo de latência entre a sessão treino e teste ($Z = - 1.703$; $p = 0,089$) apresentando perda de memória. No grupo meningite tratado com daptomicina houve diferença entre a sessão treino e a

sessão teste, ($Z = - 2.810$; $p = 0,005$) demonstrando memória aversiva adquirida neste grupo.

A Figura 4 mostra a esQUIVA inibitória de treinos contínuos. Foi demonstrado um aumento significativo no número de tentativas de treino ($t = 3.536$; $df = 18.541$; $p = 0,002$) necessário para atingir o critério de aquisição (50 segundos na plataforma) no grupo meningite tratado com ceftriaxona, quando comparado com o grupo placebo, figura 4 A. Os resultados deste trabalho sugerem que os animais do grupo meningite tratado com ceftriaxona necessitaram cerca de duas vezes mais estímulo para atingir o critério de aquisição, quando comparados com os animais do grupo controle e com o grupo meningite tratado com daptomicina. O grupo meningite tratado com ceftriaxona apresentou perda de memória e aprendizagem. No teste de retenção de memória, não houve diferença entre os grupos para todos os tempos testados, figura 4 B.

4. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços significativos no tratamento da meningite pneumocócica, a mesma continua a ser uma das mais importantes doenças infecciosas em todo o mundo e está correlacionada com elevada mortalidade e morbidade. Além disso, a maioria dos sobreviventes apresenta sequelas neurológicas permanentes [5, 6].

O presente estudo sugere um efeito benéfico da terapia com daptomicina sobre a memória e a aprendizagem em um modelo animal de meningite pneumocócica.

No teste de habituação ao campo aberto, não houve diferença entre os grupos tratados com daptomicina e ceftriaxona, sendo que os dois grupos demonstraram deficiências neste tipo de memória. No entanto, o grupo meningite tratado com daptomicina mostrou retenção de memória aversiva e os animais também apresentaram memória de reconhecimento de objetos a curto e longo prazo. No teste de esquiva inibitória de múltiplos treinos, o grupo meningite tratado com ceftriaxona precisou de aproximadamente duas vezes mais estímulo para atingir o critério de aquisição, quando comparado com o grupo meningite tratado com daptomicina.

Vários estudos sobre meningite pneumocócica experimental com resultados favoráveis foram relatados. A daptomicina inativa as bactérias no LCR de forma mais eficiente que a ceftriaxona, diminuindo a resposta inflamatória do hospedeiro, como têm sido observado na metaloproteinase de matriz-9, interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-10, interleucina-18, proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa (MIP-1 alfa) no LCR e impedindo o desenvolvimento de lesões corticais [16, 28]. Durante a multiplicação bacteriana no LCR, são liberados componentes altamente imunogênicos, que podem conduzir a um aumento da resposta imune do hospedeiro [10, 16], como demonstrado em um

modelo de meningite pneumocócica experimental, onde os animais apresentam nas primeiras 24 horas os níveis de TNF- α e CINC-1 aumentados no hipocampo e TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CINC-1 no córtex frontal [29]. Além disso, a resposta inflamatória do hospedeiro pode ser exacerbada pelos efeitos dos antibióticos bacteriolíticos [30]. Após a exposição à ceftriaxona e ao meropenem, houve uma intensa liberação de ácido teicóico (TA) e ácido lipoteicóico (LTA) no LCR, proveniente do *S. pneumoniae* [31].

A daptomicina é um agente antibiótico não-bacteriolítico ativo contra os principais patógenos Gram-positivos [11, 32], incluindo os pneumococos resistentes a penicilina e cefalosporina [33]. A daptomicina foi altamente eficaz contra pneumococos resistentes à penicilina e à quinolona [34] e, além disso, o tratamento com ceftriaxona combinado com terapia adjuvante de daptomicina atenuou os danos cerebrais e a perda de audição de forma mais eficiente do que a rifampicina em ratos infantis induzidos à meningite pneumocócica [35]. Quando as bactérias são mortas sem o rompimento de sua parede celular, proporciona-se a vantagem de reduzir a liberação de partículas bacterianas, tais como TAs, LTAs, peptidoglicano e o DNA bacteriano [36]. Estes dados poderiam ser uma explicação para a observação de que a daptomicina impediu o desenvolvimento de lesão cerebral cortical na meningite pneumocócica experimental [16] e impediu déficits de memória no nosso estudo. Estudos prévios demonstraram que 10 dias após a indução da meningite pneumocócica, os animais tratados com ceftriaxona apresentaram déficits de memória e de aprendizagem, além de comportamentos semelhantes à ansiedade e a depressão [37].

As evidências do presente estudo sugerem que o tratamento com daptomicina poderia ser uma alternativa potencial no tratamento de deficiências de aprendizagem e de memória causados por meningite pneumocócica. Investigações

futuras ainda são necessárias para fornecer maior suporte para avaliação da daptomicina como uma alternativa de tratamento para meningite bacteriana.

ABREVIATURAS

UFCol: Unidades formadoras de colônias;

CINC-1: Citocina quimioatraente indutora de neutrófilos-1;

LCR: Líquido cefalorraquidiano;

IL-1 β : Interleucina-1 Beta;

IL-6: Interleucina-6;

LTAs: Ácidos lipoteicóicos;

S. pneumoniae: *Streptococcus pneumoniae*;

TAs: Ácidos Teicóicos;

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada por concessões do CNPq, FAPESC, UNESC, projeto NENASC (PRONEX programa CNPq / FAPESC), INCT-TM, o Centro de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (NAPNA-USP, 2011.1.9333.1.3) e L'Oréal-UNESCO Brasil, Prêmio para Mulheres na Ciência 2011.

Declaração

Os autores não possuem qualquer conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Kastenbauer S, Pfister HW: **Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases.** *Brain : a journal of neurology* 2003, **126**(Pt 5):1015-1025.
2. van de Beek D, de Gans J: **Meningitis-associated hearing loss: protection by adjunctive antioxidant therapy.** *Annals of neurology* 2004, **55**(4):597-598; author reply 598.
3. Grimwood K, Anderson P, Anderson V, Tan L, Nolan T: **Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects.** *Archives of disease in childhood* 2000, **83**(2):111-116.
4. Hoogman M, van de Beek D, Weisfelt M, de Gans J, Schmand B: **Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis.** *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2007, **78**(10):1092-1096.
5. Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, van de Beek D: **Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis.** *Clinical microbiology reviews* 2011, **24**(3):557-591.
6. Sellner J, Tauber MG, Leib SL: **Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections.** *Handb Clin Neurol* 2010, **96**:1-16.
7. Gerber P, Stucki A, Acosta F, Cottagnoud M, Cottagnoud P: **Daptomycin is more efficacious than vancomycin against a methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in experimental meningitis.** *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2006, **57**(4):720-723.
8. Rennels ML, Gregory TF, Blaumanis OR, Fujimoto K, Grady PA: **Evidence for a 'paravascular' fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer protein throughout the brain from the subarachnoid space.** *Brain research* 1985, **326**(1):47-63.
9. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A: **The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall.** *The Journal of infectious diseases* 1985, **151**(5):859-868.
10. Meli DN, Christen S, Leib SL, Tauber MG: **Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*.** *Current opinion in infectious diseases* 2002, **15**(3):253-257.
11. Anastasiou DM, Thorne GM, Luperchio SA, Alder JD: **In vitro activity of daptomycin against clinical isolates with reduced susceptibilities to linezolid and quinupristin/dalfopristin.** *International journal of antimicrobial agents* 2006, **28**(5):385-388.

12. Silverman JA, Perlmutter NG, Shapiro HM: **Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus***. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**(8):2538-2544.
13. Stucki A, Cottagnoud M, Winkelmann V, Schaffner T, Cottagnoud P: **Daptomycin produces an enhanced bactericidal activity compared to ceftriaxone, measured by [3H]choline release in the cerebrospinal fluid, in experimental meningitis due to a penicillin-resistant pneumococcal strain without lysing its cell wall**. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(6):2249-2252.
14. Grandgirard D, Leib SL: **Meningitis in Neonates: Bench to Bedside**. *Clinics in Perinatology* 2010, **37**(3):655-676.
15. Grandgirard D, Steiner O, Tauber MG, Leib SL: **An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis**. *Acta neuropathologica* 2007, **114**(6):609-617.
16. Grandgirard D, Schurch C, Cottagnoud P, Leib SL: **Prevention of brain injury by the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin in experimental pneumococcal meningitis**. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(6):2173-2178.
17. Barichello T, Dos Santos I, Savi GD, Simoes LR, Generoso JS, Comim CM, Sachs D, Teixeira AL, Quevedo J: **Depressive-like-behavior and proinflammatory interleukine levels in the brain of rats submitted to pneumococcal meningitis**. *Brain research bulletin* 2010, **82**(5-6):243-246.
18. Barichello T, dos Santos I, Savi GD, Florentino AF, Silvestre C, Comim CM, Feier G, Sachs D, Teixeira MM, Teixeira AL *et al*: **Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) levels in the brain and cerebrospinal fluid after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae***. *Neurosci Lett* 2009, **467**(3):217-219.
19. Irazuzta JE, Pretzlaff RK, Zingarelli B, Xue V, Zemlan F: **Modulation of nuclear factor-kappaB activation and decreased markers of neurological injury associated with hypothermic therapy in experimental bacterial meningitis**. *Crit Care Med* 2002, **30**(11):2553-2559.
20. Irazuzta J, Pretzlaff RK, Zingarelli B: **Caspases inhibition decreases neurological sequelae in meningitis**. *Crit Care Med* 2008, **36**(5):1603-1606.
21. Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I: **Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat**. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* 2000, **7**(5):333-340.
22. de Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schroder N: **Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats**. *Behavioural brain research* 2005, **156**(1):139-143.

23. Quevedo J, Vianna M, Zanatta MS, Roesler R, Izquierdo I, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA: **Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory.** *Behav Pharmacol* 1997, **8**(8):713-717.
24. Roesler R, Schroder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MB: **Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats.** *Brain research* 2003, **975**(1-2):207-213.
25. Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH: **Mechanisms for memory types differ.** *Nature* 1998, **393**(6686):635-636.
26. Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M: **Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task.** *The European journal of neuroscience* 2003, **17**(4):897-902.
27. Roesler R, Vianna MR, de-Paris F, Quevedo J: **Memory-enhancing treatments do not reverse the impairment of inhibitory avoidance retention induced by NMDA receptor blockade.** *Neurobiology of learning and memory* 1999, **72**(3):252-258.
28. Grandgirard D, Oberson K, Buhlmann A, Gaumann R, Leib SL: **Attenuation of Cerebrospinal Fluid Inflammation by the Nonbacteriolytic Antibiotic Daptomycin versus That by Ceftriaxone in Experimental Pneumococcal Meningitis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010, **54**(3):1323-1326.
29. Stuertz K, Schmidt H, Trostdorf F, Eiffert H, Mader M, Nau R: **Lower lipoteichoic and teichoic acid CSF concentrations during treatment of pneumococcal meningitis with non-bacteriolytic antibiotics than with ceftriaxone.** *Scandinavian journal of infectious diseases* 1999, **31**(4):367-370.
30. Barichello T, Generoso JS, Collodel A, Moreira AP, Almeida SM: **Pathophysiology of acute meningitis caused by Streptococcus pneumoniae and adjunctive therapy approaches.** *Arquivos de neuro-psiquiatria* 2012, **70**(5):366-372.
31. Barichello T, dos Santos I, Savi GD, Simoes LR, Silvestre T, Comim CM, Sachs D, Teixeira MM, Teixeira AL, Quevedo J: **TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by Streptococcus pneumoniae.** *Journal of neuroimmunology* 2010, **221**(1-2):42-45.
32. Tally FP, Zeckel M, Wasilewski MM, Carini C, Berman CL, Drusano GL, Oleson FB, Jr.: **Daptomycin: a novel agent for Gram-positive infections.** *Expert opinion on investigational drugs* 1999, **8**(8):1223-1238.
33. Carpenter CF, Chambers HF: **Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2004, **38**(7):994-1000.

34. Cottagnoud P, Pfister M, Acosta F, Cottagnoud M, Flatz L, Kuhn F, Muller HP, Stucki A: **Daptomycin is highly efficacious against penicillin-resistant and penicillin- and quinolone-resistant pneumococci in experimental meningitis.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**(10):3928-3933.
35. Grandgirard D, Burri M, Agyeman P, Leib SL: **Adjunctive daptomycin attenuates brain damage and hearing loss more efficiently than rifampin in infant rat pneumococcal meningitis.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012, **56**(8):4289-4295.
36. Nau R, Eiffert H: **Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis.** *Clinical microbiology reviews* 2002, **15**(1):95-110.
37. Barichello T, Silva GZ, Generoso JS, Savi GD, Michelon CM, Feier G, Comim CM, Quevedo J: **Time-dependent behavioral recovery after pneumococcal meningitis in rats.** *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 2010, **117**(7):819-826.

Figura 1. Teste de habituação ao campo aberto 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Os dados são apresentados como média \pm EPM. $n = 10$ por grupo, e foram analisados pelo teste t de Student seguidos de ANOVA e post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$ versus Treinamento.

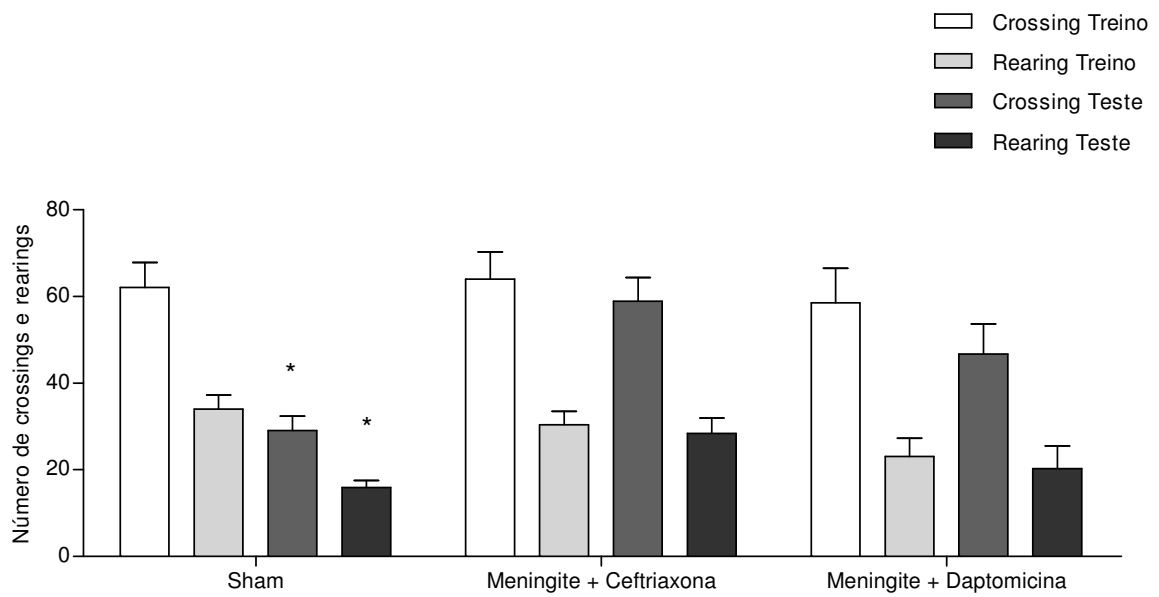


Figura 2. Teste de memória de reconhecimento de objetos 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. A memória de reconhecimento de curto prazo do teste é avaliada em 1,5 h após a formação (MCP) e a memória de reconhecimento de longa duração do teste é avaliada após 24 h depois do treino (MLP). Os dados são apresentados como médias e intervalo interquartil, e as comparações entre grupos foram realizadas utilizando teste U de Mann-Whitney, $n = 10$ por grupo. As análises dentro de cada grupo foram realizadas através de testes de Wilcoxon. * $p < 0,05$ vs teste de formação.

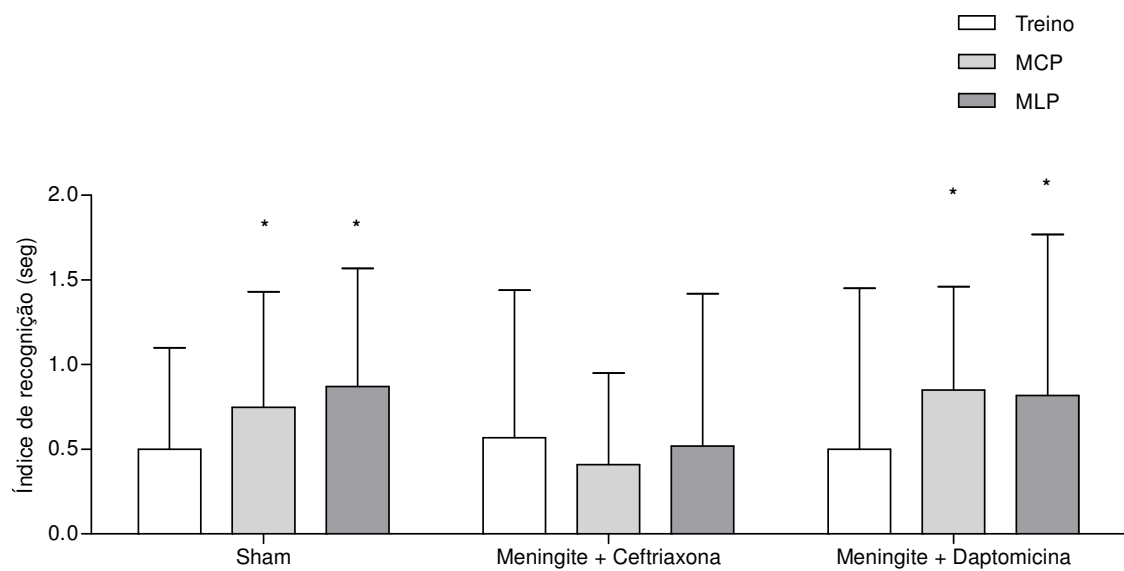


Figura 3. Tempo de latência na tarefa de esQUIVA inibitória de 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Os dados são apresentados como médias e intervalos interquartis, e as comparações entre grupos foram realizadas utilizando teste U de Mann-Whitney, $n = 10$ por grupo. As análises dentro de cada grupo foram realizadas através de testes de Wilcoxon. * $p < 0,05$ vs treino.

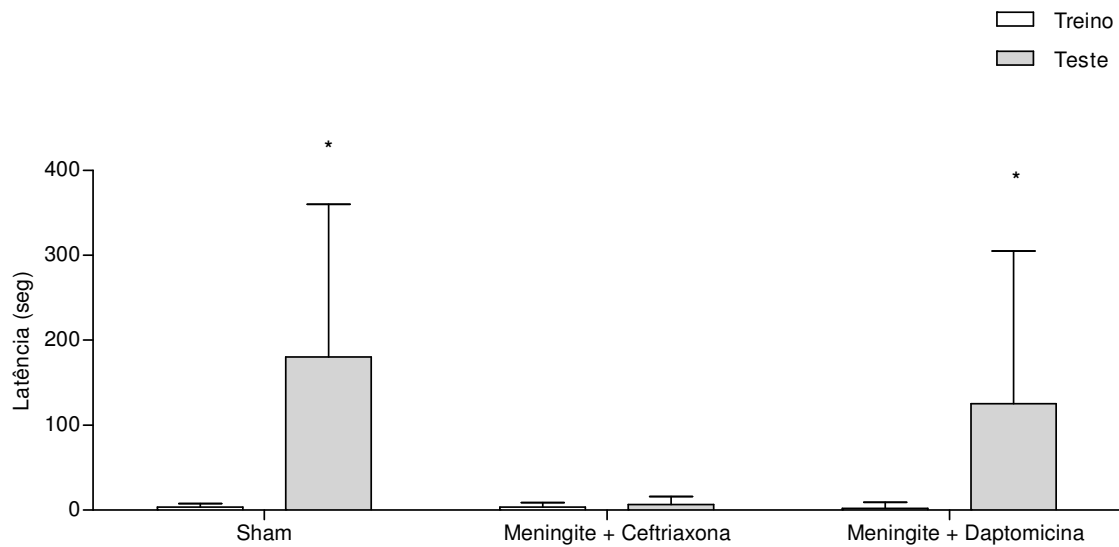
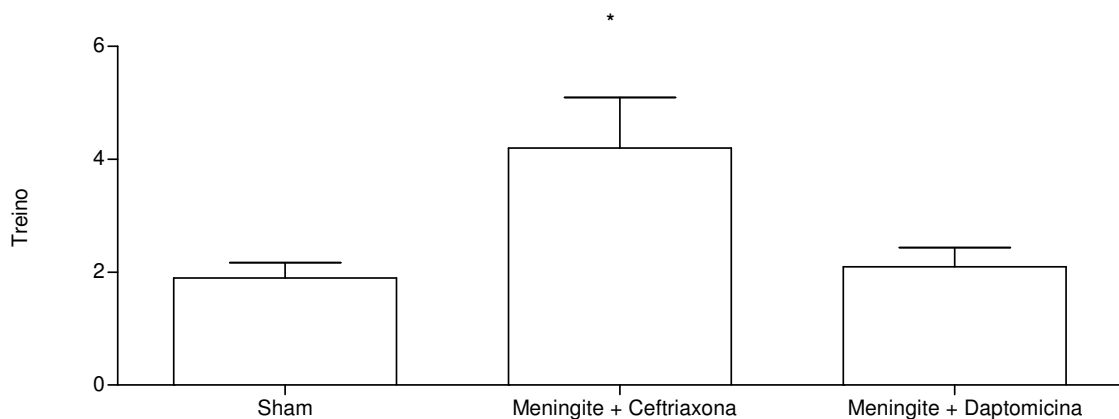


Figura 4. Esquiva inibitória de treinos contínuos 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Os dados dos ensaios são apresentados como média \pm desvio padrão, e foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey, $n = 10$ por grupo, figura 4 A. * $p < 0,05$ vs Sham. Os dados do tempo de latência é relatado como faixas medianas e interquartis, e as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Wilcoxon, figura 4 B. * $p < 0,05$ vs sham.

4 A



4 B

