

VALDEMIRA SANTINA DAGOSTIN

MENINGITE BACTERIANA INDUZIDA PELA *ESCHERICHIA COLI* K1 NO PERÍODO NEONATAL LEVA A ALTERAÇÕES COGNITIVAS, EM PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO, DO METABOLISMO ENERGÉTICO E IMUNOQUÍMICOS EM RATOS WISTAR SOBREVIVENTES

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Barichello.

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

D127m Dagostin, Valdemira Santina .

Meningite bacteriana induzida pela *Escherichia Coli* K1 no período neonatal leva a alterações cognitivas, em parâmetros de estresse oxidativo, do metabolismo energético e imunoquímicos em ratos wistar sobreviventes / Valdemira Santina Dagostin ; orientadora : Tatiana Barichello. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2017.

107 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

1. Meningite bacteriana. 2. Meningite – Complicações e sequelas. 3. Barreira hematoencefálica. 4. Estresse oxidativo. 5. Memória de habituação. 6. Citocinas. I. Título.

CDD 22. ed. 616.82



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DA 71ª DEFESA DE TESE

Ata da Defesa Pública de Tese de Doutorado de Valdemira Santana Dagostin. Aos nove dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezessete às 09h00, na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC reuniram-se os membros da Banca Examinadora, composta pelos senhores professores: **Dra. Samira da Silva Valvassori** (Membro Relator - UNESC), **Dra. Josiane Budni** (Membro Interno - UNESC), **Dra. Cristiane Damiani Tomasi** (Membro Externo - UNESC) e **Dra. Fabricia Cardoso Petronilho** (Membro Externo – UNISUL), e designados pelo Colegiado de Coordenação, a fim de argüirem a tese de Doutorado de **Valdemira Santana Dagostin**, subordinada ao título: **“Meningite bacteriana induzida pela *Escherichia coli* k1 no período neonatal leva a alterações cognitivas, em parâmetros de estresse oxidativo, do metabolismo energético e imunoquímicos em ratos Wistar sobreviventes”**. Aberta a sessão pela Presidente da mesma, coube a candidata, de forma regimental, expor o tema de sua tese, findo o que, dentro do tempo regulamentar, foi questionada pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida, procedeu às explicações que se faziam necessárias. Após esse procedimento, a Banca Examinadora reuniu-se individualmente, para a avaliação final da candidata. Retornando à sessão, a Presidente, lendo o Termo de Apresentação de Tese, declarou **Valdemira Santana Dagostin** Aprovada.

ALTERAÇÕES SUGERIDAS PELA BANCA EXAMINADORA:

Prof.ª **JOSIANE BUDNI** (Vice-Presidente do Colegiado de Coordenação)

Prof.ª **Dra. TATIANA BARICHELLO** (Orientadora)

BANCA EXAMINADORA:

Prof.ª **Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI** (Membro Relator - UNESC)

Prof.ª **Dra. JOSIANE BUDNI** (Membro Interno - UNESC)

Prof.ª **Dra. CRISTIANE DAMIANI TOMASI** (Membro Externo - UNESC)

Prof.ª **Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO** (Membro Externo – UNISUL)

CANDIDATA:

Valdemira S. Dagostin
VALEMIRA SANTINA DAGOSTIN

Criciúma, SC, 09 de fevereiro de 2017.

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações Laboratório de Microbiologia Experimental, Laboratório de Neurociências e Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, Laboratório Imunofarmacologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pelo dom da vida, cuidador do meu ontem, hoje e do amanhã.

À Profa. Dra. Tatiana Barichello, orientadora, por seu acolhimento, respeito, dedicação, paciência, por me proporcionar participação do seu grupo de pesquisa e acima de tudo poder estar ao seu lado compartilhando sua experiência profissional e seus ensinamentos. Pelo acolhimento sempre caloroso, é um modelo a ser seguido.

À Jaqueline Generoso, Lutiana Roque Simões, Allan Colladel, Ana Paula Moreira, Cristiano Faller, e a todos os demais colegas do Laboratório de Microbiologia Experimental pelo seu apoio e incentivo na realização deste trabalho, por me auxiliarem nas dificuldades do dia a dia.

Aos colegas do Curso de Enfermagem pelo suporte quando necessário e apoiando para conclusão deste trabalho.

A esta universidade – UNESC, por apoiar seus professores ao aprimoramento profissional sempre.

Aos professores da banca, por aceitarem fazer parte da avaliação deste trabalho.

À minha família, esposo e principalmente a minha filha Sarah Dagostin Ferraz, por entender a minha ausência nesta caminhada de aperfeiçoamento profissional, pelo abraço nas madrugadas, a conversa tantas vezes não proporcionada. Obrigado minha princesa.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de certa forma estiveram sempre torcendo por mim, incentivando-me e confiando em meu potencial para que pudesse concluir este trabalho.

A todos, muito obrigada!

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

RESUMO

Apesar dos avanços na terapia antimicrobiana e nos cuidados intensivos avançados, a meningite bacteriana neonatal tem uma taxa de mortalidade superior a 10% e induz seqüela neurológica em 20 a 50% dos casos. *Escherichia coli* K1 (*E. coli* K1) é o organismo gram-negativo mais comum que causa meningite neonatal. O objetivo desse estudo foi avaliar as alterações imunológicas e bioquímicas, integridade da barreira hematoencefálica no período neonatal e parâmetros comportamentais na vida adulta de ratos Wistar submetidos à meningite por *E. coli* K1. Para os experimentos foram utilizados ratos Wistar que tinham 3 e 4 dias de vida e que receberam líquido cefalorraquidiano (LCR) artificial ou 10 µL de suspensão bacteriana contendo *E. coli* K1 na concentração de 1×10^6 UFCol/ml, na cisterna magna, nos animais pertencentes ao grupo meningite. Após 6, 12, 24, 48 e 96 h, da indução, os animais foram mortos. Os resultados apontam que no hipocampo, a interleucina (IL)-4 aumentou em 96 h, IL-6 em 12, 48 e 96 h, IL-10 em 96 h e a citocina quimiotática indutora de neutrófilos (CINC-1) em 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h, e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em 48 e 96 h. No LCR, os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) aumentaram em 6, 12, 24, 48 e 96 h. Os parâmetros de estresse oxidativo, incluindo os equivalentes de malondialdeído (MDA), formação de carbonilação de proteínas, atividade mieloperoxidase (MPO), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a infecção. Além disso, os grupos sulfidril, os níveis de nitrito e nitrato e as atividades das enzimas mitocondriais da cadeia respiratória (complexo I, II, III e IV) também foram avaliados no córtex frontal e no hipocampo. Os resultados deste estudo demonstraram o aumento significativo da carbonilação de proteína em 24, 48 e 72 h, MDA em 12, 24, 48, 72 e 96 h, MPO em 24, 48 e 72 h, e diminuição na atividade da SOD em 12, 24, 48 e 72 h no hipocampo de animais neonatos sobreviventes à meningite. Atividade da CAT não apresentou diferença significativa. Além disso, observou-se também o aumento significativo da atividade do complexo IV no hipocampo em 24 e 72 h e no córtex frontal em 24 e 96 h de ratos sobreviventes à meningite. A quebra da BHE ocorreu às 12 h no hipocampo e iniciou as 6 h no córtex cerebral. Assim, os resultados deste estudo reafirmam o papel do estresse oxidativo, óxido nítrico e seus compostos relacionados na fisiopatologia da meningite induzida por *E. coli* K1. Nos resultados dos parâmetros comportamentais na idade adulta os animais foram avaliados quanto à memória de

habituação, aversiva e de reconhecimento de objeto e comportamentos do tipo depressivo. Os animais mostraram comprometimento da memória de habituação e aversiva. Desta forma este modelo animal de meningite é uma importante ferramenta para estudar as sequelas cognitivas e comportamentais em longo prazo induzida pela meningite no período neonatal.

Palavra – Chave: *Escherichia coli*, meningite, memória, Barreira Hematoencefalica , citocinas.

ABSTRACT

Despite advances in antimicrobial therapy and advanced intensive care, neonatal bacterial meningitis has a mortality rate greater than 10% and induces neurological sequela in 20 to 50% of cases. *Escherichia coli* K1 (*E. coli* K1) is the most common gram-negative organism that causes neonatal meningitis. The objective of this study was to evaluate the immunochemical and biochemical changes, integrity of the blood-brain barrier in the neonatal period and behavioral parameters in adult life of Wistar rats submitted to *E. coli* K1 meningitis. For the experiments Wistar rats that were 3 and 4 days old were given artificial cerebrospinal fluid (CSF) or 10 μ l of bacterial suspension containing *E. coli* K1 at a concentration of 1×10^6 UFCol / ml, in the magna cistern, in the Animals belonging to the meningitis group. After 6, 12, 24, 48 and 96 h of induction, the animals were killed. The results indicate that in the hippocampus, interleukin (IL) -4 increased by 96 h, IL-6 at 12, 48 and 96 h, IL-10 in 96 and neutrophil-inducing chemotactic cytokine (CINC-1) at 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) at 48 and 96 h. In CSF, levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) increased by 6, 12, 24, 48 and 96 h. The oxidative stress parameters, including the equivalents of malondialdehyde (MDA), protein carbonylation formation, myeloperoxidase activity (MPO), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) at 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h After infection. In addition, sulfhydryl groups, nitrite and nitrate levels and mitochondrial activities of the respiratory chain (complex I, II, III and IV) were also evaluated in the frontal cortex and hippocampus. The results of this study demonstrated a significant increase in protein carbonylation at 24, 48 and 72 h, MDA at 12, 24, 48, 72 and 96 h, MPO at 24, 48 and 72 h and a decrease in SOD activity in 12, 24, 48 and 72 h in the hippocampus of neonatal animals surviving meningitis. CAT activity did not present a significant difference. In addition, a significant increase in IV complex activity in the hippocampus at 24 and 72 h and in the frontal cortex in 24 and 96 h of mice surviving meningitis was also observed. BBB rupture occurred at 12 h in the hippocampus and started at 6 h in the cerebral cortex. Thus, the results of this study reaffirm the role of oxidative stress, nitric oxide and its related compounds in the pathophysiology of meningitis induced by *E. coli* K1. In the results of behavioral parameters in adulthood, the animals were evaluated for habituation, aversive memory and object recognition and depressive type behaviors. The animals showed habituation and aversive memory impairment. Thus, this animal model

of meningitis is an important tool to study the long-term cognitive and behavioral sequelae induced by meningitis in the neonatal period.

key-words: *Escherichia coli*, meningitis, memory, BBB, cytokines

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fisiopatologia da meningite bacteriana por <i>E. coli</i>	36
Figura 2 - Migração dos leucócitos.....	38
Figura 3 - Representação das principais citocinas secretadas pelos macrófagos em resposta a produtos bacterianos.....	39
Figura 4 - Travessia da barreira hematoencefálica pelo mecanismo transcelular por <i>E. coli</i> através de células endoteliais microvasculares cerebrais.....	43
Figura 5 - Linha de tempo representativa para avaliação dos parâmetros de citocinas, quimiocinas, estresse oxidativo, defesa enzimática, cadeia respiratória mitocondrial e integridade da BHE.....	49
Figura 6 - Linha de tempo representativa para avaliação de parâmetros comportamentais.....	50
Figura 7 - Teste de habituação ao campo aberto.....	55
Figura 8 - Teste de esQUIVA inibitória.....	56
Figura 9 - Memória de reconhecimento de objeto.....	57
Figura 10 - Teste de nado forçado.	58
Figura 11 - Curva de sobrevivência, através da curva de Kaplan-Meier dos animais submetidos a meningite por <i>E. coli</i> K1.....	60
Figura 12 - Avaliação dos níveis de TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, CINC-1 e BDNF no hipocampo de ratos Wistar neonatos em 6, 12, 24, 48 e 96 h após a indução de meningite por <i>E. coli</i> K1.....	61
Figura 13 - Avaliação dos níveis de TNF- α no LCR de ratos Wistar neonatos em 6, 12, 24, 48 e 96 h após a indução de meningite por <i>E. coli</i> K1.....	62
Figura 14 - Avaliação dos níveis de dano oxidativo e defesas antioxidante no hipocampo e córtex frontal de ratos Wistar neonatos em 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a indução de meningite por <i>E. coli</i> K1.....	63
Figura 15 - Atividade dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial no hipocampo e córtex frontal de ratos Wistar neonatos em 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a indução de meningite por <i>E. coli</i> K1.....	66
Figura 16 - Integridade da BHE no hipocampo (A) e córtex cerebral (B) em 6, 12, 18, 24 e 30 h após a indução da meningite.....	67
Figura 17 - Teste de habituação em campo aberto em ratos Wistar adultos submetidos à meningite por <i>E. coli</i> K1 no período neonatal.	68

Figura 18 - Tarefa de esquiva inibitória em ratos Wistar adultos submetidos à meningite por <i>E. coli</i> K1 no período neonatal.....	69
Figura 19 - Teste de esquiva inibitória de múltiplos treinos em ratos Wistar adultos submetidos à meningite por <i>E. coli</i> K1 no período neonatal.....	70
Figura 20 - Teste de reconhecimento de objetos novos em ratos Wistar adultos submetidos à meningite por <i>E. coli</i> K1 no período neonatal....	71
Figura 21 - Teste de nado forçado em ratos Wistar adultos submetidos à meningite por <i>E. coli</i> K1 no período neonatal.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise da Variância (do inglês, *Analysis of variance*)
BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, *Brain Derived Neurotrophic Factor*)
BHE: Barreira Hematoencefálica (do inglês, *Blood-Brain Barrier*)
CAT: Catalase
CEUA: Comissão de Ética em Uso de Animais
CINC-1: Citocina Quimiotática Indutora de Neutrófilos-1 (do inglês, *Cytokine-Induced Neurophil Chemoattractant Type 1*)
DNA: ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)
ELISA: Ensaio Imunoenzimático (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)
EPM: Erro Padrão da Média
ERO: Espécies Reativas ao Oxigênio
ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio
GBS: Streptococcus do grupo B
GPx: Glutathione peroxidase
H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio
Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b
IgA: imunoglobulina A
IL: Interleucina
I.p.: Intraperitoneal
IRAK-4: Receptor de Interleucina Associado à Quinase 4 (do inglês, *Interleukin Receptor Associated Kinase 4*)
LCR: Líquido Cefalorraquidiano
LPS: Lipopolissacarídeo
MCP-1: Proteína quimioatrativa de monócitos
MP: Metaloproteínas
MPO: Mieloperoxidase (do inglês, *Myeloperoxidase*)
MDA: Malondialdeído
MMPs: Metaloproteinases de Matriz
MyD88: Fator de Diferenciação Mielóide 88 (do inglês, *Myeloid Differentiation Factor 88*)
NM: Nanometro
NFK B Fator Nuclear kappa β (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*)
NOD: Domínio de ligação de nucleotídeos e oligomerização (do inglês, *Nucleotide Binding Oligomerization Domain*)
NT-3: Neurotrofina-3
O₂: Ânion Superóxido

OH-: Radical hidroxila
ONOO: Peroxinitrito
OMS: Organização Mundial Saúde
PAF: Fator de Ativação de Plaquetas (do inglês, *Platelet Activating Factor*)
PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*)
PPAR: Receptor Proliferador de Peroxissoma (do inglês, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*)
PRRs: Receptores de Reconhecimento Padrão (do inglês, *Pattern Recognition Receptors*)
SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNC: Sistema Nervoso Central
SNP Sistema Nervoso Periférico
SOD: Superóxido dismutase
SPSS: Pacote Estatístico para Ciências Sociais (do inglês, *Statistical Package for Social Sciences*)
TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *Thiobarbituric acid reactive substances*)
TIR: Receptor de interleucina Toll (do inglês, *Toll Interleukine Receptor*)
TLRs: Receptores Toll-like (do inglês, *Toll-like Receptors*)
TMB: Ácido ditionitrobenzóico (do inglês, *acid ditionitrobenzóico*)
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alpha (do inglês, *Tumor Necrosis Factor alpha*) TRAF: Fator associado ao fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumour Necrosis Factor Receptor-Associated Factor*)
TRAK: Fator associado ao fator de necrose tumoral quinase (do inglês, *Tumour Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Kinase*)
UFCol/mL: Unidade Formadora de Colônias por mL
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
UNESC: Universidade do Extremo Sul Catarinense
VEFG: Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 MENINGITE.....	31
1.2 EPIDEMIOLOGIA	33
1.3 FISIOPATOLOGIA	35
1.4 CITOCINAS E QUIMIOCINAS	38
1.5 FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)	41
1.6 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA (BHE)	42
1.7 ESTRESSE OXIDATIVO	43
1.8 JUSTIFICATIVA	45
2. OBJETIVOS	46
2.1 GERAL	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA	47
3.2 ORGANISMO INFECTANTE	47
3.3 PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DA MENINGITE	47
3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS	48
3.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF-A, IL-6, IL-4, IL-10 E CINC-1.....	50
3.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BDNF	51
3.7 DANO OXIDATIVO E DEFESA ENZIMÁTICA.....	51
3.7.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	51
3.7.2 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil... 51	
3.7.3 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo sulfidril.. 52	
3.7.4 Atividade da mieloperoxidase (MPO)	52
3.7.5 Determinação da concentração de nitrito/nitrato.....	52
3.7.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). 52	
3.8 ATIVIDADES DAS ENZIMAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.....	53
3.9 INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA POR AZUL DE EVANS.....	53
3.10 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	54
3.10.1 Habituação ao campo aberto.....	54
3.10.2 Esquiva Inibitória.....	55
3.10.3 Esquiva inibitório de múltiplos treinos.....	56
3.10.4 Memória de reconhecimento de objetos	56
3.10.5 Teste do Nado Forçado	57

3.11 CURVA DE KAPLAN MEIER	58
3.12 ESTATÍSTICA.....	59
4. RESULTADOS.....	60
4.1 CURVA DE SOBREVIVENCIA	60
4.2 NÍVEIS DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E BDNF	60
4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	67
5 DISCUSSÃO	73
6 CONCLUSÃO	82
REFERENCIAS	83
ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	104
ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	105
ANEXO C - ARTIGO PUBLICADO	106
ANEXO D - ARTIGO SUBMETIDO.....	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 MENINGITE

A meningite bacteriana é uma infecção do sistema nervoso central (SNC), caracterizada por uma forte inflamação das meninges e espaço subaracnóide (Grandgirard et al., 2007a), causando prejuízos neuropsicológicos e cognitivos, através de uma reação inflamatória e apoptótica, independente do organismo patogênico (Leib et al., 1996; Koedel e Pfister, 1999; Irazuzta et al., 2005). A meningite bacteriana continua sendo importante causa de morbidade e mortalidade em neonatos e crianças (De Louvois et al., 2005; Ehrenstein et al., 2005; Kim, 2012) e deve ser diagnosticada e tratada precocemente (Celik et al., 2007).

A meningite ocorre com maior frequência no período neonatal que em outros momentos da vida e contribui significativamente com os altos índices de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Osrin et al., 2004; Furyk et al., 2011). As crianças e os neonatos são particularmente vulneráveis à meningite bacteriana devido à imaturidade do sistema imune (Pong e Bradley, 1999) e a incidência varia entre 0,22 e 2,5 por 1000 nascidos vivos (Heath et al., 2011; Nizet, 2011).

Meningite neonatal é uma doença caracterizada pela inflamação das meninges que ocorre nos primeiros 28 dias de vida (Haussen et al., 2005) O microrganismo causador de meningite neonatal tende a variar de acordo com o país, no entanto, um número relativamente pequeno de agentes patogênicos como *Streptococcus agalactiae* e bacilos Gram negativos como, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter diversus* e *Listeria monocytogenes* (Roos e Van De Beek, 2010). Em crianças, jovens e adultos são mais frequentes *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) como causas de meningite bacteriana (Weisfelt et al., 2006; Stephens, 2007).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que existem cerca de cinco milhões de mortes neonatais por ano no mundo, 98% ocorrem em países em desenvolvimento. A meningite neonatal está entre as cinco principais infecções causadoras de mortes (Stoll, 1997; Furyk et al., 2011). O avanço na produção e distribuição de vacinas conjugadas de amplo espectro tem sido considerado importante na prevenção desta patologia (Bottomley et al., 2012).

A meningite neonatal tem sido considerada uma enfermidade com maior grau de dificuldade em seu diagnóstico devido sua inespecificidade dos sintomas clínicos no início da doença (Akpede et al., 1994; Mook-Kanamori et al., 2011). A imaturidade do sistema imune é considerada uma condição predisponente à sepse e meningite, sobretudo daqueles nascidos prematuramente. Com morbimortalidades significativa apesar dos avanços na quimioterapia antibacteriana e nos cuidados especializados (Harvey et al., 1999; Brouwer et al., 2010).

Entre os micro-organismos causadores, o *S. agalactiae* é o agente mais comum de meningite neonatal (Ansong et al., 2009), sendo citado com 52% dos casos nos Estados Unidos, com taxa de mortalidade de aproximadamente 30% (Meli et al., 2006; Ansong et al., 2009). Em neonatos, a meningite ocasionada pelo *S. pneumoniae* pode atingir de 1 a 11% e esta associada com prolongada ruptura de membrana placentária, prematuridade e pneumonia (Hoffman et al., 2003), causando a infecção aguda mais severa no SNC. A fonte dos patógenos normalmente é a mãe ou o ambiente pós-natal, como vias de infecção transplacentária (*L. monocytogenes*), vertical durante o parto (*E. coli* e *Streptococcus B*) ou horizontal após o nascimento (infecções *estafilocócicas* adquiridas em berçários) (Faria e Farhat, 1999).

Apesar dos protocolos de profilaxia intraparto, o *Streptococcus* do grupo B (GBS) manteve-se como a causa mais comum de sepse neonatal e meningite desde o início de 1980, sendo responsável por mais de 40% de todas as infecções de início precoce (Heath et al., 2011; Stoll et al., 2011). A *E. coli* é o segundo agente patogênico mais comum, sendo isolado em 30% de todas as infecções de início precoce (Stoll et al., 2011) que inicia nos primeiros seis dias de nascimento e reflete a transmissão vertical da flora do trato genital materno (May et al., 2005). Desde a década de 90, a *E. coli* tem emergido como a mais comum causa de sepse precoce e meningite em neonato muito baixo peso (MBP, ou seja, < 1500 g de peso ao nascer) e prematuridade (Camacho-Gonzalez et al., 2013; Ku et al., 2015).

Entre os agentes patogênicos, *E. coli* é a bactéria mais comum entre os bacilos causadores de meningite no período neonatal. Estirpes de *E. coli* que possuem o antígeno polissacarídeo capsular K1 são predominantes (cerca de 80%) entre os isolados de meningite neonatal (Korhonen et al., 1985). Estas estirpes de *E. coli* causam aproximadamente 40% dos casos de septicemia e 80% dos casos de meningite (Kim, 2008).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

O recém-nascido é particularmente suscetível à infecção bacteriana sistêmica durante as primeiras quatro semanas de vida. Em países em desenvolvimento, a meningite juntamente com outras infecções, prematuridade e asfixia ao nascer, são as principais causas de morbimortalidade (Osrin et al., 2004; Furyk et al., 2011; Birchenough et al., 2013).

No mundo, os casos notificados de meningite bacteriana estão em torno de 1,2 milhões, sendo responsáveis por 172 mil mortes anuais (Liechti et al., 2015). No Brasil, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) em 2014, foram confirmados 17.434 casos de meningites. Do total de casos, 34% (n = 5.848) foram registrados como etiologia bacteriana. Em menores de dois anos de idade foram confirmados 1.570 casos de meningites: 37% foram de origem bacteriana, 41% viral, 19% não especificada e 1% de meningite por outra etiologia. Entre os casos de meningite bacteriana, 34% foram meningite meningocócica, 47% como meningites por outras bactérias e 13% como meningite pneumocócica (Svs, 2014).

Em países desenvolvidos, *E. coli* e GBS são responsáveis pela maioria dos casos de meningite bacteriana neonatal, e as bactérias isoladas do líquido cefalorraquidiano (LCR) de neonatos infectados invariavelmente possuem uma cápsula protetora de polissacarídeo. Dos isolados de *E. coli* neuroinvasivos, 80 a 85% expressam a cápsula K1 (Robbins et al., 1974; Korhonen et al., 1985) que permite que essas estirpes evitem a detecção por um sistema imune inato neonatal submetido a um processo de maturação dependente da idade (Birchenough et al., 2013).

A *E. coli* K1 é a principal causa de meningite neonatal em pré-termos em países em desenvolvimento e a segunda bactéria envolvida após o GBS em crianças a termo, esta associada à infecção urinária durante a gestação (Houdouin et al., 2002; Gaschignard et al., 2012). As taxas de mortalidade por *E. coli* em neonatos são altas, semelhantes à meningite pneumocócica, em torno de 15% a 40%. Aproximadamente 50% dos sobreviventes de meningite apresentam sequelas neurológicas, como alteração de comportamento, perda auditiva, retardamento mental, anormalidades motoras, convulsões e prejuízo na aprendizagem (Bonacorsi e Bingen, 2005; Allocati et al., 2013).

Nos Estados Unidos, dados revelaram uma incidência anual de meningite bacteriana de 3 a 6 casos, na França de 2,23 casos por

100.000 habitantes (Honda e Warren, 2009; Varon, 2009). Infelizmente, a mortalidade e morbidade da meningite apresenta elevado custo hospitalar. Nos Estados Unidos, a meningite responde por cerca de US\$ 72 mil em internações e até US\$ 1,2 bilhões em custos hospitalares anualmente (Honda e Warren, 2009).

Dois terços das mortes por meningite em países de baixa renda ocorrem entre crianças menores de quinze anos de idade (Kim, 2010). A meningite bacteriana ocorre em até 15% dos recém-nascidos com bacteremia. Entre as crianças com doença invasiva por GBS de 5 a 10% com infecções de início precoce e 25% das crianças com infecções de início tardio têm meningite (Jordan et al., 2008; Phares et al., 2008). Aproximadamente 430 milhões de pessoas vivem na área conhecida como “cinturão da meningite”, na África subsaariana, que abrange desde o Senegal até Etiópia. Mesmo com o tratamento com antimicrobianos adequados, cerca de 10% dos pacientes morrem e até 20% ficam com sequelas definitivas, como perda auditiva e danos cerebrais (Brouwer et al., 2010).

Na França, GBS e *E. coli* são responsáveis por mais de 80% das bactérias envolvidas na meningite neonatal precoce e tardia (Gaschignard et al., 2011) como em outros países desenvolvidos (Holt et al., 2001; May et al., 2005) como Suécia, Itália, Noruega e demais países europeus (Allocati et al., 2013). Em dados franceses de 2001-2007, a mortalidade de meningite por *E. coli* e GBS foram comparáveis entre 12 e 13% (Gaschignard et al., 2012). Ainda na França foram pesquisados pacientes menores de 18 anos com meningite por *E. coli* em 233 unidades de pediatria e 168 laboratórios nos anos de 2001 a 2013. Verificou-se que a meningite por *E. coli* foi sete vezes mais frequente em recém nascidos prematuros que a termo. A incidência mundial foi de 5,3 para 100.000 habitantes. No Reino Unido e na Irlanda foram de quatro para cada 100.000 habitantes. A taxa de mortalidade foi de 9,2%, sendo duas vezes maior em recém-nascidos prematuros. A maior parte dos casos de meningite por *E. coli* ocorreu na faixa etária 0-3 dias e de 11-15 dias de nascimento (Basmaci et al., 2015).

A taxa de letalidade para países desenvolvidos é de 4,5%, enquanto que em países com baixa renda varia de 15 a 50% (Molyneux et al., 2002; Brandt, 2010). Mesmo com o advento dos antibióticos, as taxas de morbidade e mortalidade associadas à meningite bacteriana permanecem elevadas (Koedel e Pfister, 1999; Mook-Kanamori et al., 2011).

1.3 FISIOPATOLOGIA

Na meningite bacteriana o processo infeccioso ocorre com a invasão e proliferação bacteriana no espaço intravascular e desta forma a maioria dos micro-organismos causadores da patologia, conseguem atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e adentrar ao espaço subaracnóideo. A meningite bacteriana neonatal pode ocorrer pela invasão do micro-organismo no SNC através da mãe pelo trato vaginal (May et al., 2005), principalmente no trabalho de parto, quando os micro-organismos deslocam-se da vagina para o líquido amniótico ou há ruptura das membranas (Verani et al., 2010). Após atingir um limiar de bacteremia ($> 10^3$ unidades formadoras de colônia por mililitro de sangue), a *E. coli* K1 penetra na BHE e invade o SNC (Kim, 2001; 2008). No SNC, a bacteremia e a ativação de células imuno residentes induzem a liberação de moléculas pró-inflamatórias que aumentam a permeabilidade da BHE e atraem um grande número de leucócitos para o LCR, processo denominado de pleocitose (Scheld et al., 2002; Kim, 2003; Xie et al., 2004).

Ao atravessar a BHE, o micro organismo prolifera-se no SNC, resultando em inflamação, que é responsável pela maioria dos sintomas da infecção do SNC, inclusive instabilidade na temperatura, convulsões, irritabilidade ou letargia e má alimentação ou vômitos e estado mental alterado. A inflamação também aumenta a permeabilidade da BHE, o que pode causar seu rompimento e comprometer ainda mais a integridade do SNC (Somand e Meurer, 2009).

Uma vez alcançado o SNC, o micro-organismo pode replicar-se dentro do espaço subaracnóideo concomitantemente com a liberação dos produtos bacterianos que conduzem a uma resposta inflamatória (Koedel et al., 2010). Os compostos bacterianos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são altamente imunogênicos e provocam intensas respostas inflamatórias no hospedeiro. Estes compostos são reconhecidos pelas células apresentadoras de antígenos através da ligação aos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), incluindo os receptores *Toll-like* (TLRs) (Hanke e Kielian, 2011).

Após a liberação de lipopolissacarídeo (LPS) por *E. coli* inicia-se a sinalização intracelular, que depende da transmissão de sinal do domínio citoplasmático do TLR ao receptor de interleucina-1 associado à quinase 4 (IRAK-4), sendo este ativado (Cohen, 2002). A ativação de IRAK-4 é facilitada pela proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88). O IRAK-4 estimula, então, o fator associado ao fator de

necrose tumoral (TRAF) e, conseqüentemente, o fator associado ao fator de necrose tumoral quinase (TRAK) (Annane et al., 2005). Em seguida, o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) é liberado e se desloca para o núcleo da célula, que se liga ao DNA, ativando centenas de genes específicos que promovem a expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina (IL) 1 β e também moléculas anti-inflamatórias como a IL-10 (Zingarelli, 2005; Wang et al., 2016) (figura 1).

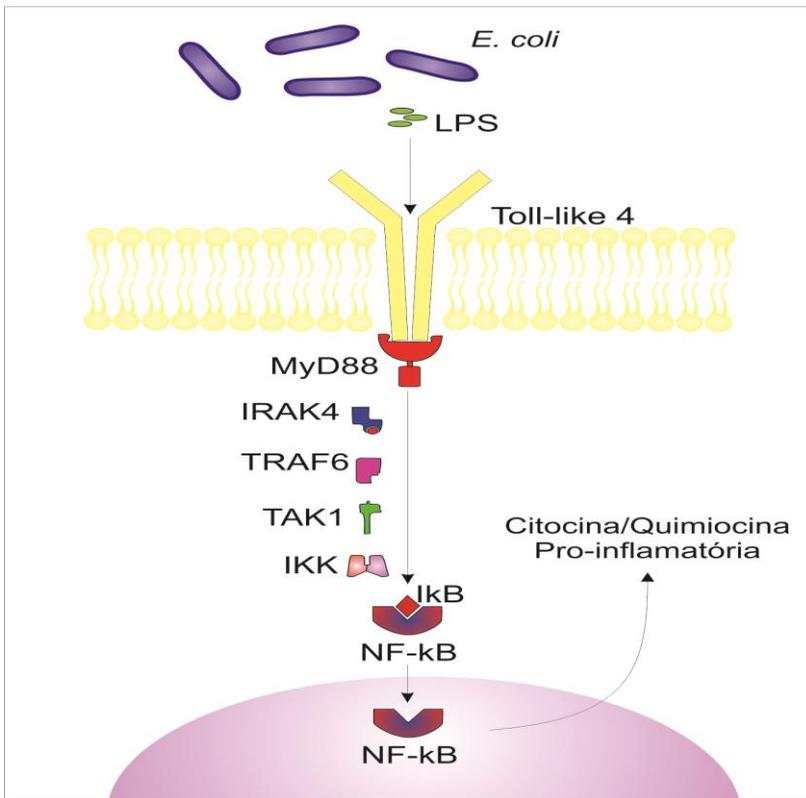


Figura 1 - Fisiopatologia da meningite bacteriana por *E. coli*. Fonte do autor. *E. coli*: *Escherichia coli*; I κ B: Inibidor de fator nuclear kappa B; IKK: Inibidor de I κ B quinase; IRAK4: receptor de interleucina associado à quinase 4; LPS: Lipopolissacarídeo; MyD88: Fator de diferenciação mielóide 88; NF- κ B: fator nuclear kappa B; TAK1: fator associado ao crescimento quinase 1; TRAF 6: fator associado ao fator de necrose tumoral 6.

Devido à produção de citocinas e quimiocinas, leucócitos polimorfonucleares são atraídos e ativados. O sialyl-Lewisx, um sulfatado de glicoproteínas presente na superfície dos leucócitos, importante na ligação e rolamento de leucócitos, liga-se às proteínas selectina P e E nas células endoteliais. As citocinas inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) também são necessárias para induzir a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e ICAM-2. A ligação entre as células endoteliais e as ICAM-1 permite a passagem de neutrófilos em direção ao gradiente de concentração de substâncias quimioatraentes (Hanna e Etzioni, 2012) (figura 2).

Consequentemente, grandes quantidades de espécies reativas ao oxigênio (ERO) são produzidas (Kastenbauer et al., 2002a), levando à peroxidação lipídica, quebra no DNA, dano mitocondrial e nitração da tirosina, e/ou diminuição das defesas antioxidantes, provocada pelo estresse oxidativo (Klein et al., 2006). Esses eventos inflamatórios podem causar danos cerebrais como edema cerebral, aumento da pressão intracraniana, hipoxemia, além de problemas trombóticos e vasculite com a lesão neuronal e repercussões locais ou difusas, muitas vezes irreversíveis (Brandt, 2010).

A lesão microvascular através do dano oxidativo (Schaper et al., 2002) e a alteração inflamatória dos vasos resulta na perda da autorregulação vascular cerebral, vasoespasmo e trombose reversível ou permanente. A vasculatura cerebral de recém-nascidos é particularmente suscetível à vasculite. Muitas vezes resulta no desenvolvimento de necrose cortical, o que leva déficits sensorio-motor, epilepsia e cegueira cortical (Weisfelt et al., 2006), podendo ocorrer apoptose no giro denteado de células hipocâmpais que está associada à disfunção da memória e da aprendizagem em sobreviventes de meningite (Leib et al., 2003).

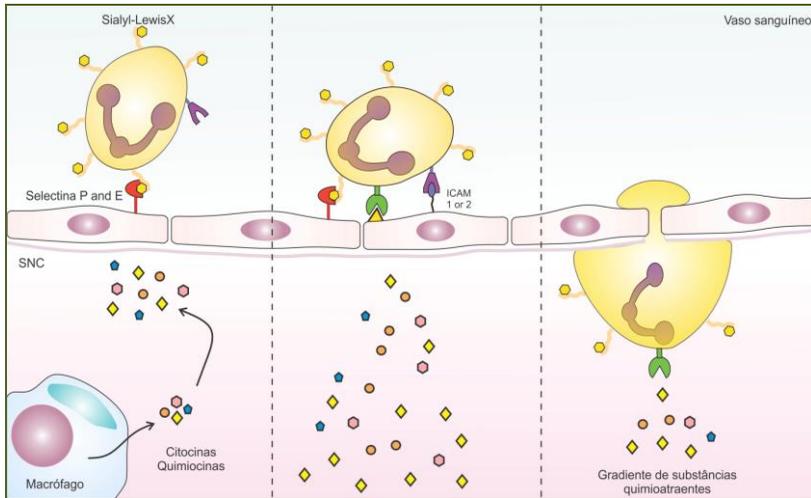


Figura 2 - Migração dos leucócitos adaptado de Barichello et al., 2013.

1.4 CITOCINAS E QUIMIOCINAS

Muitas células cerebrais como astrócitos, células gliais, células endoteliais, células ependimais e macrófagos residentes podem produzir citocinas e moléculas pró-inflamatórias em resposta a replicação bacteriana e seus componentes (Kronfol e Remick, 2000; Van De Beek et al., 2004; Barichello et al., 2014b). A resposta defensiva ocorre após a interação entre o micro-organismo e o hospedeiro, que envolve tanto componentes do sistema imune humoral como o celular (Mook-Kanamori et al., 2011). Em condições patológicas como inflamações agudas, crônicas ou dano tecidual, o sistema imune é ativado e ocorre um aumento da produção de macrófagos, liberação de citocinas, como o $TNF-\alpha$, $IL\ 1\beta$ e $IL-6$ (Janeway e Travers, 2014) e seus receptores têm sido produzidos pelo próprio SNC, principalmente pelos astrócitos e microglia (Muller e Ackenheil, 1998) (figura 3).

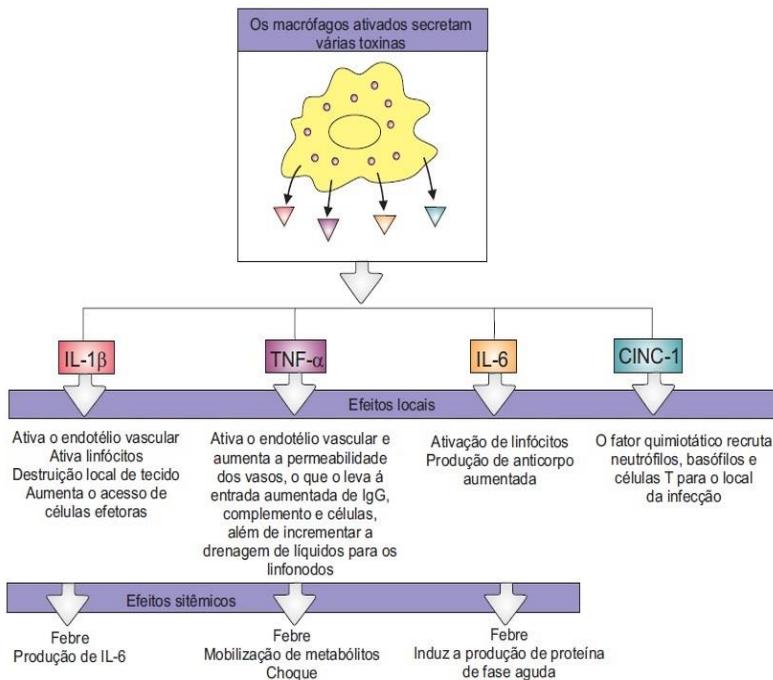


Figura 3 - Representação das principais citocinas secretadas pelos macrófagos em resposta a produtos bacterianos. Adaptada de Janeway e Travers 2014.

O TNF- α é uma citocina produzida em resposta às lesões inflamatórias, infecciosas ou estimulada por macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células estruturais, tais como fibroblastos, células musculares lisas, astrócitos e microglia (Kronfol e Remick, 2000). Esse mediador é uma citocina de relevância na resposta inflamatória prévia, sendo considerada uma molécula pró-inflamatória, que aumenta a resposta imune para acelerar a eliminação do patógeno e melhorar a eficácia no processo inflamatório (Sellner et al., 2010). Os níveis elevados de TNF- α têm sido relacionados com os efeitos patológicos em uma variedade de doenças infecciosas, neurológicas, neurodegenerativas e condições neurotóxicas (Sharief et al., 1992; Sriram e O'callaghan, 2007; Barichello et al., 2009). O TNF- α possui efeitos citotóxicos, atividade antiviral e ativa o fator de transcrição e de regulação da resposta imune. Além disso, estimula a liberação de IL-1 β no SNC, que por sua vez é essencial para a produção de IL-6 (Rusconi et al., 1991).

A citocina pró-inflamatória IL-1 β possui capacidade de induzir grande quantidade de genes, geralmente não expressos em estados normais de saúde, e aumenta a expressão de quase todas as outras citocinas, tais como: o TNF- α , IL-6 e quimiocinas, bem como, moléculas de adesão. Essa citocina age como estimulante de medula óssea, aumentando o número de células progenitoras mielóides e promovendo a liberação de neutrófilos, o que resulta em neutrofilia (Dinarello, 2005).

A citocina IL-6 é uma proteína pró-inflamatória produzida durante a resposta de fase aguda a estímulos, como trauma, insulto cirúrgico ou infecção (Janeway e Travers, 2014). Tem um importante papel na formação da memória, aprendizagem, cognição e emoção. Atua na indução de proteínas de fase guda e seus efeitos são predominantemente pró-inflamatórios (Gruol e Nelson, 2005; Nelson et al., 2012). Também atua como uma citocina anti-inflamatória, importante na meningite bacteriana, reduzindo a infiltração de leucócitos, ou seja, sua falta aumenta a resposta inflamatória, mas contribuindo para o aumento da pressão intracraniana, aumentando a permeabilidade da BHE (Nelson et al., 2012).

A IL-10 é uma citocina produzida pelos monócitos, macrófagos, linfócitos B e T, neurônios e células da neuroglia sendo responsável pela inibição de produção de citocinas pró-inflamatórias, estimulação de macrófagos e redução da fagocitose de neutrófilos (Mook-Kanamori et al., 2011). Está também envolvida no controle das reações da imunidade natural e da imunidade mediada por células (Abbas et al., 2012).

A citocina quimiotática indutora de neutrófilos-1 (CINC-1) é uma quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos para o SNC e implicada na filtração de células inflamatórias para o parênquima cerebral, podendo também atuar como uma proteína de fase aguda após dano cerebral (Janeway e Travers, 2014). A quimiocina CINC-1 é para o rato o equivalente à citocina IL-8 para humanos. A IL-8 é uma citoquina quimioatratante produzida por uma variedade de tecidos e células sanguíneas como macrófagos, células epiteliais e linfócitos T, esta quimiocina é um dos principais mediadores da resposta inflamatória (Bickel, 1993) e esta envolvida na regulação e crescimento em seres humanos e elevada expressão está associada a uma gama de doenças inflamatórias (Abdelmoez et al., 2014).

As quimiocinas relacionadas na fisiopatologia da meningite em humanos são as IL-8, proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1) e interferon gama de proteína indutível (IP-10). Estas quimiocinas são as

responsáveis pela atração para o SNC de neutrófilos, monócitos e linfócitos T ativados (Grygorczuk et al., 2001).

1.5 FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)

As neurotrofinas formam uma família de proteínas com características estruturais semelhantes, por possuírem um gene ancestral comum. Sua principal função é regular o desenvolvimento, manutenção e função dos neurônios do SNC e do sistema nervoso periférico (SNP), incluindo controle da função, plasticidade sináptica e modulação da sobrevivência neuronal (Harada et al., 2007).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é um componente das neurotrofinas e o mais difundido fator de crescimento no cérebro, exercendo efeitos na transmissão sináptica, estimulação neurogênica e esta envolvida em processos de plasticidade sináptica, sendo produzido principalmente pelas células da glia e pelos núcleos neuronais (Martinez-Levy e Cruz-Fuentes, 2014).

Cada neurotrofina se liga a um tipo de receptor Trk. O BDNF se liga ao TrkB, para promover plasticidade neuronal, contudo, pode se ligar também ao receptor de neurotrofina de baixa afinidade p75 (p75NTR) e induzir morte celular programada. Estes efeitos opostos do BDNF são importantes para a regulação de neurônios em desenvolvimento (Kimura et al., 2016).

O BDNF é uma proteína responsável pelo processo de neurogênese, atuando na capacidade que o SNC possui de modificar algumas das suas propriedades morfológicas e funcionais em resposta a alterações, incluindo influência do meio ambiente, estado emocional e cognição (Huang et al., 2008; Sen et al., 2008). Dos vários fatores de crescimento, o BDNF é produzido durante toda a vida para preservar as funções essenciais como aprendizagem e memória (Della et al., 2013). Em um estudo de Barichello (Barichello et al., 2010a) e colaboradores foi evidenciado uma correlação entre os baixos níveis de BDNF e a presença de déficits comportamentais em ratos submetidos à meningite neonatal por *S. pneumoniae*.

A utilização de BDNF exógeno mostrou ser eficaz na neuroproteção em ratos submetidos à meningite bacteriana experimental, sendo postulado que este mediador poderia estar envolvido na homeostase do cálcio neuronal, na prevenção da morte celular pela modulação de ERO e por apoptose (Grandgirard e Leib, 2006; Li et al., 2007).

1.6 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA (BHE)

A BHE é uma barreira estrutural e funcional formada pelas células endotélias, astrócitos e pericitos. Essas células mantêm o microambiente neural regulando a passagem de moléculas para dentro e para fora do cérebro e protegendo-o de quaisquer micro-organismos e toxinas que circulam no sangue (Kim, 2003; 2008). A BHE não apenas gera um ambiente estável para a função neural, mas também mantém a composição iônica ótima para a função de sinalização sináptica, sendo responsável pela separação da circulação sistêmica do SNC (Sellner et al., 2010).

Um crescente número de resultados *in vitro* e *in vivo* sustentam a ideia de que os astrócitos são células excitáveis e desempenham um papel importante no processamento de informações e modulação da atividade neuronal (Giaume et al., 2010). Neste sentido o papel dos astrócitos na manutenção e sinalização das células endoteliais da microvasculatura cerebral tem sido estudado na gênese de diferentes doenças e na integridade da BHE (Willis et al., 2004).

O recrutamento e a interação dos pericitos com o endotélio é essencial para a formação, maturação e manutenção da BHE. Os pericitos comunicam-se diretamente com as células endoteliais através das invaginações referidas como *peg socket* em que um único periócito pode estar em contato com várias células endoteliais, permitindo uma camada adicional de comunicação e de estabilidade mecânica dos vasos. Os pericitos são células cerebrais contráteis que regulam o fluxo sanguíneo capilar desempenhando um papel importante na manutenção da BHE com a auto-regulação e homeostase cerebral (Armulik et al., 2005). Foi determinado em estudos *in vivo* que as interações de pericitos com células endoteliais são críticas para regular a BHE e que a ruptura dessas interações pode levar a disfunção desta barreira e a neuroinflamação (Daneman et al., 2010). Além disso, estudos *in vitro* demonstram que os pericitos expressam moléculas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEFG) e as metaloproteinases de matriz (MMPs), que regulam a integridade da BHE (Thanabalasundaram et al., 2010).

As bactérias podem atravessar a BHE por diversos mecanismos: via transcelular, paracelular transversal e em fagócitos infectados. A via transcelular refere-se à penetração microbiana através de células de barreira sem qualquer evidência de microrganismos entre as células ou de interrupção das junções intercelulares. A via paracelular o micro-organismo atravessa a BHE entre as células da barreira com e/ou sem

evidência de interrupção das junções. O mecanismo de cavalo de Tróia envolve penetração microbiana das células da barreira usando transmigração dentro os fagócitos infectados. A *S. pneumoniae*, a *S. agalactiae* e a *E. coli* podem atravessar a BHE através do mecanismo transcelular (Kim, 2003). A travessia transcelular ocorre quando o micro-organismo penetra as células sem qualquer evidência intracelular de dano (Kim, 2008) (figura 4).

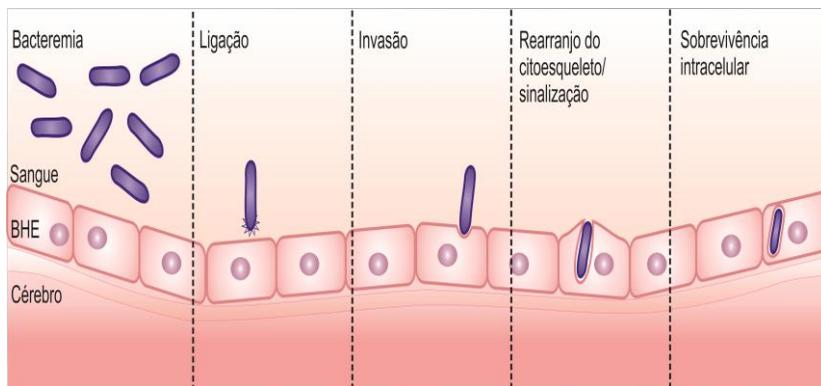


Figura 4 - Travessia da barreira hematoencefálica pelo mecanismo transcelular por *E. coli* através de células endoteliais microvasculares cerebrais. Fonte: (Kim, 2003).

1.7 ESTRESSE OXIDATIVO

A instalação do estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes (Barbosa et al., 2010), em favor da geração excessiva de espécies reativas ou em detrimento da remoção desses (Halliwell e Whiteman, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2007). O sistema de defesa antioxidante tem o objetivo primordial de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos se ampliem culminados em danos sistêmicos irreparáveis. Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, sobretudo, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. (Barbosa et al., 2010).

Os radicais livres são moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados em orbitais atômicos ou moleculares (Halliwell e Whiteman, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2007). As ERO podem ser definidas como moléculas derivadas da redução parcial do oxigênio molecular que reagem com moléculas orgânicas e são citotóxicas,

podendo induzir a morte celular neuronal. Em baixas concentrações, essas moléculas atuam em processos celulares de defesa contra agentes patogênicos e reosta mitogênica (Valko et al., 2007).

Os mecanismos de defesa contra o excesso de ERO envolvem a atividade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. No grupo de defesas enzimáticas antioxidantes encontram-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), a glutaciona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). Enquanto que no grupo de antioxidantes não-enzimáticos estão ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutaciona, carotenóides, flavonóides e outros (Valko et al., 2007). Em condições normais, a produção de espécies reativas é balanceada pelo sistema de defesa antioxidante no organismo. Entretanto, quando a geração de espécies reativas excede a capacidade das defesas antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo (Droge, 2002).

O processo de estresse oxidativo é determinado pelo balanço entre a quantidade de espécies oxidantes geradas e a capacidade dos processos metabólicos de produzir antioxidantes (Halliwell e Whiteman, 2004). O SNC é especialmente vulnerável aos efeitos deletérios do estresse oxidativo, e isso ocorre devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados, que podem ser alvos das ERO, e por possuir uma baixa concentração das defesas antioxidantes (De Menezes et al., 2009).

Na meningite bacteriana, a inflamação ocasionada pelo micro-organismo aumenta a produção de leucócitos polimorfonucleares que provoca a lise celular bacteriana e, simultaneamente, os leucócitos aumentam a liberação de ERO, como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) resultando em dano endotelial e aumento da permeabilidade da BHE (Leib e Täuber, 1999; Kastenbauer et al., 2002a). Após a interação entre o micro-organismo e o hospedeiro ocorre a resposta de defesa, que envolve tanto componentes do sistema imune humoral como o celular. As células mononucleares desempenham um papel fundamental, liberando uma variedade de interleucinas e uma série de outras moléculas, como quimiocinas, mediadores lipídicos como o fator ativador de plaquetas, prostaglandinas, leucotrienos e ERO (Brandt, 2010). A produção maciça de ERO leva a danos colaterais que contribuem para processos neuroinflamatórios e a propagação da doença (Klein et al., 2006).

1.8 JUSTIFICATIVA

A meningite bacteriana mesmo com todos os avanços no diagnóstico e na terapêutica dos últimos anos, ainda constitui uma ameaça à vida em todos os grupos etários, as taxas de morbidade e mortalidade por meningite neonatal continuam altas e as sequelas neurológicas incluem a perda de audição, convulsões, déficits neurológicos focais, aprendizagem e perda de memória. Conhecer um pouco mais sobre a fisiopatologia da meningite neonatal por *E. coli* se torna necessário na tentativa de minimizar os danos ocasionados pelo patógeno e também pela resposta imune exacerbada do hospedeiro. Como hipótese foi levantada que a meningite neonatal pode causar prejuízo cognitivo em longo prazo desencadeado pela resposta imune inata.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar as alterações imunoquímicas e bioquímicas, integridade da barreira hematoencefálica no período neonatal e parâmetros comportamentais na vida adulta de ratos Wistar submetidos à meningite por *E. coli* K1.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar os níveis de TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, CINC-1 e BDNF no hipocampo e no LCR os níveis de TNF- α em ratos neonatos em 6, 12, 24, 48 e 96 horas após a indução da meningite por *E. coli* K1.
- ✓ Avaliar o dano oxidativo e defesa enzimática antioxidante no hipocampo e córtex frontal em ratos Wistar neonatos em 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a indução da meningite por *E. coli* K1.
- ✓ Avaliar a atividade dos complexos I,II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial no hipocampo e córtex frontal em ratos Wistar neonatos em 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a indução da meningite por *E. coli* K1.
- ✓ Avaliar a integridade da BHE no hipocampo e córtex cerebral em ratos Wistar neonatos nos tempos de 6, 12, 18, 24 e 30 horas após a indução da meningite pela *E. coli* K1.
- ✓ Avaliar a memória de habituação, memória aversiva e memória de reconhecimento de objetos novos e comportamento semelhante à depressão em ratos Wistar adultos submetidos à meningite por *E. coli* K1 no período neonatal.
- ✓ Analisar através da curva de Kaplan-Meier a sobrevivência de ratos Wistar neonatos após a indução da meningite por *E. coli* K1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Experimental, Laboratório de Neurociências e Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, Laboratório Imunofarmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais UNESC 165/2008 e 11/2010 (anexo 1 e 2) e estão de acordo com o Instituto Nacional de Saúde Guia para o Cuidado e Utilização de Laboratório Animais (NIH Publicações No. 80-23).

3.2 ORGANISMO INFECTANTE

O micro-organismo, *E. coli* K1, proveniente do Instituto Adolfo Lutz, foi cultivado em 10 ml de caldo *Todd Hewitt*, Himedia®, 24 horas antes do procedimento. No dia do experimento, a cultura foi diluída em meio fresco e obtido crescimento até a fase logarítmica, em seguida foi centrifugada durante 10 min a 5000 x g e novamente suspensa em solução salina estéril (NaCl 0,9%) para uma concentração 1×10^6 UFCol/mL. O tamanho do inóculo foi confirmado por culturas quantitativas (Grandgirard et al., 2007a; Barichello et al., 2010a).

3.3 PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DA MENINGITE

Foram utilizados ratos Wistar machos (15 a 20 g de peso corporal), provenientes do biotério da UNESC. Todos os procedimentos de indução da meningite e inoculações bacterianas foram realizados sob anestesia, composta de uma administração intraperitoneal (i.p.) de cloridrato de cetamina (6,6 mg/kg) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg) (Grandgirard et al., 2007b; Hoogman et al., 2007).

Os animais foram submetidos a uma punção na cisterna magna com uma agulha de calibre 23. Os animais receberam 10 µL de LCR artificial estéril ou um volume equivalente de suspensão de *E. coli* K1. No momento da inoculação, os animais receberam reposição volêmica e foram subseqüentemente devolvidos às suas gaiolas (Irazutza et al., 2002; Irazutza et al., 2008). Após a recuperação da anestesia, os animais retornam a caixa moradia com suas mães.

Dezoito horas após a indução a meningite foi confirmada por uma cultura quantitativa de 5 µL de LCR obtido por punção da cisterna magna (Grandgirard et al., 2007a; Grandgirard et al., 2007b; Grandgirard e Leib, 2010). Os animais submetidos aos testes comportamentais 60 dias após o nascimento receberam tratamento com antimicrobiano (100 mg/kg de ceftriaxona) a cada 12 h durante 7 dias.

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para avaliação da concentração de citocinas (TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10), quimiocinas (CINC-1) e BDNF os animais foram randomizados e divididos em 6 grupos experimentais: controle; meningite 6 horas; meningite 12 horas; meningite 24 horas; meningite 48 horas e meningite 96 horas, com um n de 4-6 animais por grupo. Os animais foram eutanasiados por decapitação nos tempos acima descritos após a indução da meningite e em seguida a retirada do hipocampo foi imediatamente isolada e armazenada a -80 °C para posterior análise. (cor vermelha, figura 5).

Para avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo, defesa enzimática e atividade dos complexos mitocondriais os animais foram randomizados e divididos em sete grupos experimentais: controle; meningite 6 horas; meningite 12 horas; meningite 24 horas, meningite 48 horas, meningite 72 horas e meningite 96 horas, com um n de 6 animais por grupo, totalizando 42 animais.

Os animais foram eutanasiados por decapitação nos tempos acima descritos após a indução da meningite e em seguida as estruturas cerebrais hipocampo e córtex cerebral foram imediatamente isoladas e armazenadas a -80 °C para posterior análise dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) , carbonilação de proteínas, ácido ditionitrobenzóico (TMB), nitrito/nitrato, atividade de Mieloperoxidase (MPO), Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (cor azul, figura 5).

Para avaliação da integridade da BHE, os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: controle (n = 6) e meningite (n = 6) e eutanasiados em diferentes tempos: 6, 12, 18, 24 e 30 h após a indução da meningite. O total de 60 animais para avaliação da integridade da BHE (Cor verde, figura 5).

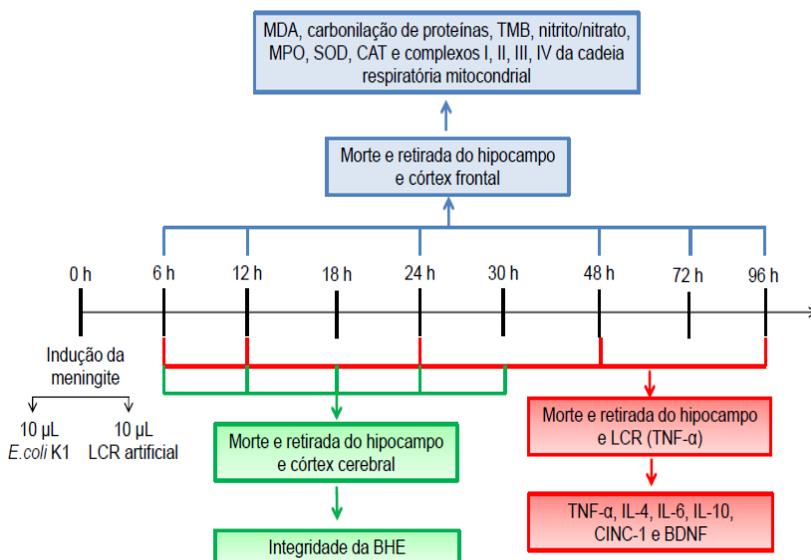


Figura 5 - Linha de tempo representativa para avaliação dos parâmetros de citocinas, quimiocinas, estresse oxidativo, defesa enzimática, cadeia respiratória mitocondrial e integridade da BHE. Fonte do autor, 2017

Protocolo para os testes comportamentais: a memória de longa duração foi avaliada através das tarefas de esQUIVA inibitória, esQUIVA inibitória de treinos contínuos, reconhecimento de objetos e no teste de habituação ao campo aberto. Os parâmetros semelhantes à depressão foram avaliados através do teste de nado forçado.

Os animais foram divididos em dois grupos: controle e meningite (n = 12 animais em cada grupo), total de 120 animais. Dezoito horas após a indução da meningite os animais receberam tratamento com Ceftriaxona 100 mg/Kg via i.p. a cada 12 horas durante 7 dias (Barichello et al., 2013a) e permaneceram com as mães até o desmame, realizado no 21º dia de vida. Ao completarem sessenta dias de vida, os animais foram submetidos aos testes comportamentais (Figura 6).

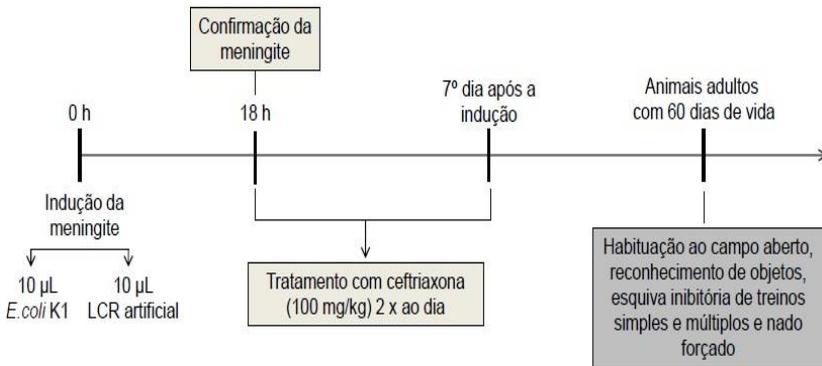


Figura 6 - Linha de tempo representativa para avaliação de parâmetros comportamentais. Fonte do autor, 2017.

3.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF-A, IL-6, IL-4, IL-10 E CINC-1

Os animais foram mortos por decapitação após anestesia, nos tempos já descritos, e o hipocampo removido e imediatamente isolado e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores análises.

As estruturas foram homogeneizadas em solução de extração (100 mg de tecido por 1 mL) contendo: 0,4 mol/L de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de BSA, 0,1 mmol/L de fluoreto de fenil metil sulfonil, 0,1 mmol/L de cloreto de benzetônio, 10 mmol/L de EDTA e 20 de KI a aprotinina, utilizando Ultra-Turrax (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). O homogenato do hipocampo foi centrifugado a $3000 \times g$ durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e os sobrenadantes recolhidos e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A concentração de citocinas e quimiocina foi determinada utilizando a metodologia de enzima e um ensaio de ELISA. Os sobrenadantes do tecido cerebral foram dosados em uma configuração de ELISA utilizando anticorpos comercialmente disponíveis, de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante (*R & D Systems, Minneapolis, MN*).

3.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BDNF

Os níveis BDNF foram mensurados por ensaio imunoenzimático, utilizando-se kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (BDNF de Chemicon, EUA). Resumidamente, fatias de hipocampo foram homogeneizadas em tampão fosfato (PBS) com 1 mM de flúor fenilmetilsulfonil (PMSF) e etileno glicol 1mM bis (2-aminoetil éter)-N, N, N'N' ácido tetra acético (EGTA). Placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram revestidas por 24 h com as amostras diluídas 1:2 em diluente de amostra.

Então, as placas foram lavadas quatro vezes com diluentes amostras. Anticorpo monoclonal de rato anti-BDNF, foi diluído 1:1000 em diluente de amostra e foram incubadas por 3 h em temperatura ambiente. Após a lavagem, uma segunda incubação com anti-rato conjugado 1:1000 do anticorpo peroxidase diluída para 1 h em temperatura ambiente foi realizado.

Após a adição de estreptavidina-enzima-substrato, e a quantidade de BDNF, foi determinada para absorvância de 450 nm. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica (DO) e a concentração de BDNF. A proteína total foi medida pelo método de Lowry (1951) usando soro albumina bovina como padrão (Lowry et al., 1951).

3.7 DANO OXIDATIVO E DEFESA ENZIMÁTICA

3.7.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como indício de peroxidação lipídica foi medido níveis de TBARS durante uma reação ácida aquecida como previamente descrito (Draper e Hadley, 1990). Brevemente, as amostras obtidas foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico, fervidas por 15 minutos e após a quantidade de TBARS foi determinada pela absorvância em 535 nm.

3.7.2 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil

O dano oxidativo em proteínas foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme previamente descrito (Levine et al., 1990). Brevemente, as amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas

dissolvidas com dinitrofenilhidrazina. Os grupamentos carbonil foram medidos pela absorbância em 370 nm.

3.7.3 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo sulfidril

O dano oxidativo em proteínas foi determinado pela medida dos grupamentos sulfidril conforme previamente descrito (Aksenov e Markesbery, 2001). Brevemente, as amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas dissolvidas em ácido ditionitrobenzóico(TMB), após os grupamentos sulfidril foram medidos pela absorbância em 412 nm.

3.7.4 Atividade da mieloperoxidase (MPO)

Os tecidos foram homogeneizados (50 mg/mL) em 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugado a 15.000 g durante 40 min. A suspensão foi sonicada três vezes durante 30 s. Uma parte do sobrenadante foi misturado com solução de tetrametilbenzidina 1,6 mM e 1 mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A atividade foi medida espectrofotometricamente, como a variação de absorvância a 650 nm a 37 °C (De Young et al., 1989).

3.7.5 Determinação da concentração de nitrito/nitrato

A concentração de nitrito/nitrato foi medida em alíquotas de tecido, utilizando a reação de Griess por adição de 100 µl de reagente (0,1% [w/v] em H₂O e 1% [w/v] de sulfanilamida em 5% [v/v] de H₃PO₄ e concentrar o volume [1:01] para a amostra de 100 µl. A densidade óptica foi mensurada a 550 nm utilizando um leitor de ensaio enzimático (Etiology and clinical signs of serious infections in young infants in developing countries: a WHO collaborative study).

3.7.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio em 240 nm conforme previamente descrito (Aebi, 1984; Bannister e Calabrese, 1987). A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente conforme previamente descrito (Lissi et al., 1995).

3.8 ATIVIDADES DAS ENZIMAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

A atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial foi avaliada no hipocampo e córtex frontal dos animais submetidos à meningite. NADH-desidrogenase ou NADH: ubiquinona - oxidorreductase (Complexo I) foi avaliada segundo o método descrito por Cassina e Radi (Cassina e Radi, 1996), pela taxa de redução NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm, a atividade do succinato desidrogenase (complexo II) ubiquinona - citocromo *c* oxidorreductase (complexo III) foi determinada de acordo com o método de Fischer (Fischer et al., 1985). A atividade do complexo II foi determinada pela diminuição da absorbância causada pela redução do 2,6-dicloroindofenol (DCIP) em 600 nm. A atividade do complexo II-III foi determinada pelo aumento da absorbância causado pela redução do citocromo *c* em 550 nm. A atividade do citocromo oxidase (Complexo IV) foi avaliada segundo o método descrito por Rustin (Rustin et al., 1994), através do decréscimo na absorbância, devido à oxidação de citocromo *c* previamente reduzido em 550 nm. As atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial foram expressos em nmol/min x mg/proteína.

3.9 INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA POR AZUL DE EVANS

A integridade da BHE foi analisada através do extravasamento do corante azul de *Evans* (Smith e Hall, 1996). Os animais foram anestesiados, com uma dose intraperitoneal de cloridrato de cetamina 6,6 mg/kg e cloridrato de xilazina 0,3 mg/kg (Grandgirard et al., 2007b; Hoogman et al., 2007), foi então administrado 1 mL de azul de Evans (1% dissolvido em solução salina 0,9%) por via intravenosa através da veia femoral uma hora e meia antes de serem eutanasiados (Kawai et al., 2001) em seguida o tórax foi aberto e o cérebro perfundido com 200 mL de solução salina 0,9% através do ventrículo esquerdo na pressão de 100 mmHg até que o fluido de perfusão incolor foi obtido a partir do átrio direito.

Após os animais foram mortos por decapitação, sendo as estruturas hipocampo e córtex retiradas e armazenadas a -80 °C para o

posterior teste bioquímico. Para avaliação da BHE, as amostras foram pesadas e colocadas em 50% de solução tricloroacética.

Após homogeneização e centrifugação, o corante extraído foi diluído com etanol (1:3) e determinada a sua fluorescência (excitação em 620 nm e emissão a 680 nm) com um espectrofotômetro de espectrofluorímetro (Hitachi 650-40, Tóquio, Japão). Os cálculos foram baseados no padrão externo (62,5-500 ng/mL) no mesmo solvente. O teor de azul de Evans no tecido foi quantificado a partir de uma linha padrão linear derivada de quantidades conhecidas do corante e expressa por grama de tecido.

3.10 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.10.1 Habituação ao campo aberto

O comportamento foi avaliado no aparato de campo aberto, a fim de avaliar as atividades locomotoras e exploratórias. O aparelho mede 40 cm × 60 cm de campo aberto cercado por 50 cm de parede feita de madeira com um vidro frontal. O piso do campo aberto é dividido em 9 retângulos por linhas pretas (figura 7).

Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante traseiro esquerdo e, em seguida, deixados sozinhos para explorar a arena por 5 min (sessão treino). Imediatamente após este procedimento, os animais foram levados novamente para a sua gaiola e 24 horas depois foram submetidos a uma nova sessão no aparelho de campo aberto (sessão de teste). Durante 5 minutos, em ambas as sessões, foram observadas e documentadas todas as vezes que o animal cruzou as linhas pretas (*crossings*) ou se apoiou com as patas traseiras levantando as dianteiras, atividade exploratória (*rearings*). A diminuição do número *crossings* e *rearings* entre as duas sessões foi tomado como uma medida da retenção de memória de habituação (Vianna et al., 2000).

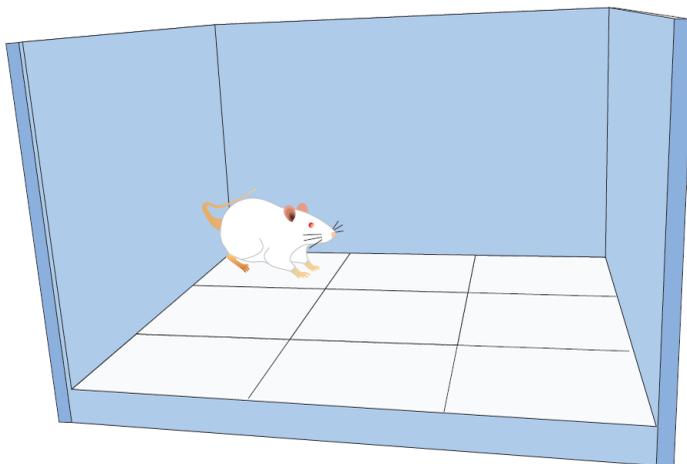


Figura 7 - Teste de habituação ao campo aberto. Fonte: do autor, 2017.

3.10.2 Esquiva Inibitória

Este teste comportamental avalia a memória aversiva. O aparelho e os procedimentos têm sido descritos em estudos anteriores (Quevedo et al., 1997; Roesler et al., 2003). Resumidamente, o aparato consiste em uma caixa de acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm (Albarsch, Porto Alegre, Brasil), cujo piso consiste em barras paralelas de aço inoxidável (diâmetro de 1 mm) espaçadas em uma distância de 1 cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento é colocada junto à parede esquerda do aparelho, conforme figura 8.

Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo que estes levaram para descer sobre as grades com as quatro patas foi medida com um dispositivo automático. Imediatamente após tocarem com as quatro patas na grade, os animais receberam um choque de 0,4 mA durante 2 segundos e voltaram à sua gaiola de origem (figura 10). Os animais que ficaram mais de vinte segundos na plataforma na sessão de treino foram descartados.

A sessão teste foi realizada 24 horas após o treinamento (memória de longo prazo). Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele levou para descer (latência), porém não foi administrado o choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória (Quevedo et al., 1997).

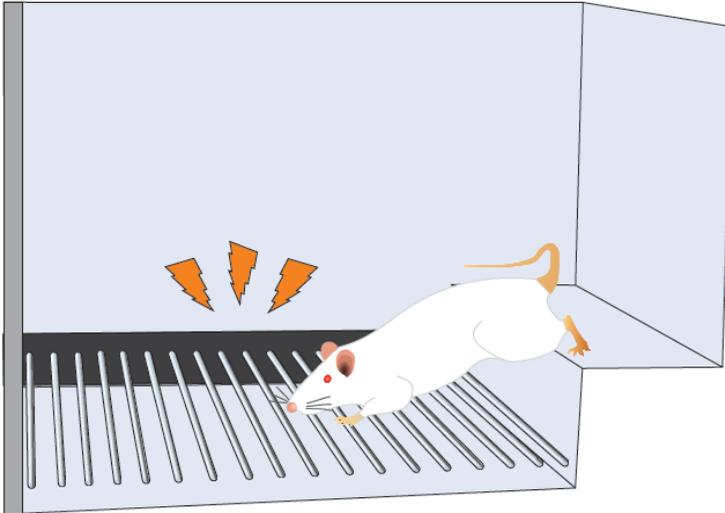


Figura 8 - Teste de esquiwa inibitória. Fonte: do autor, 2017.

3.10.3 Esquiwa inibitório de múltiplos treinos

Nesse teste usa-se também a esquiwa inibitória, qual as características já foram descritas anteriormente. Na sessão de treino o animal foi colocado na plataforma e imediatamente depois de pisar nas barras de metal, recebe um choque 0,4 mA, durante 2 segundos. Este procedimento continuou até que o animal permanecesse na plataforma por 50 segundos, sendo registrado o número de estímulos elétricos ministrados ao animal. O animal foi devolvido então à sua caixa moradia.

No dia seguinte, 24 horas após o treino, o animal foi recolocado na plataforma e contou-se o tempo de permanência deste animal sobre a plataforma (tempo limite sobre a plataforma 180 segundos), se o animal desceu antes de completar o tempo limite não foi administrado choque (Bevilaqua et al., 2003).

3.10.4 Memória de reconhecimento de objetos

Para a realização deste teste, usou-se o aparato de habituação ao campo aberto, cuja descrição já foi relatada anteriormente. No primeiro dia foi realizado o treino, o animal foi colocado cuidadosamente no quadrado do canto posterior esquerdo do aparato e explorou o

ambiente por 5 minutos. O primeiro dia serve como habituação do animal.

No segundo dia o animal foi recolocado no aparato, o qual continha dois objetos iguais. O objeto A e objeto B (forma, tamanho e cor), conta-se o tempo que o animal explora cada objeto (A e B). Após 24h do treino foi realizado o teste da memória de longa duração, em que o animal explorou novamente o ambiente na presença do primeiro objeto familiar (objeto A) e o novo objeto (objeto C) e contou-se novamente o tempo total que o animal explora cada objeto. 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 novo B). Exploração foi definida como *sniffing* (explorar o objeto 3-5 cm de distância a partir dele) ou tocar o objeto com o nariz e/ou patas dianteiras (De Lima et al., 2005) (figura 9).

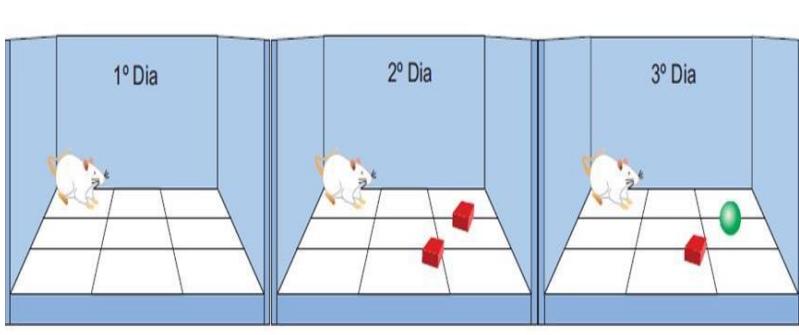


Figura 9 - Memória de reconhecimento de objeto. Fonte: do autor, 2017.

3.10.5 Teste do Nado Forçado

O teste do nado forçado é frequentemente utilizado em modelo animal para avaliar comportamento do tipo depressivo (Porsolt, 1979; Einat et al., 2001; Tuon et al., 2008). Envolve duas exposições a um tanque cilíndrico de água em que os ratos não podem tocar o fundo ou escapar. O tanque é feito de vidro transparente, 80 cm de altura, 30 cm de diâmetro, e cheias com água (22-23 °C) até uma profundidade de 40 cm. A água no tanque foi trocada para cada rato. Para a primeira exposição, os ratos foram colocados na água durante 15 minutos (sessão de treino). Após 24 horas, os ratos foram novamente colocados na água para uma sessão de 5 min (sessão de teste) (figura 10). O tempo de

imobilidade foi analisado na sessão de teste. Os ratos foram considerados imóveis sempre que param de nadar e escalar. Foram avaliados como parâmetros de imobilidade, que incluem imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar (Porsolt, 1979; Detke et al., 1995).

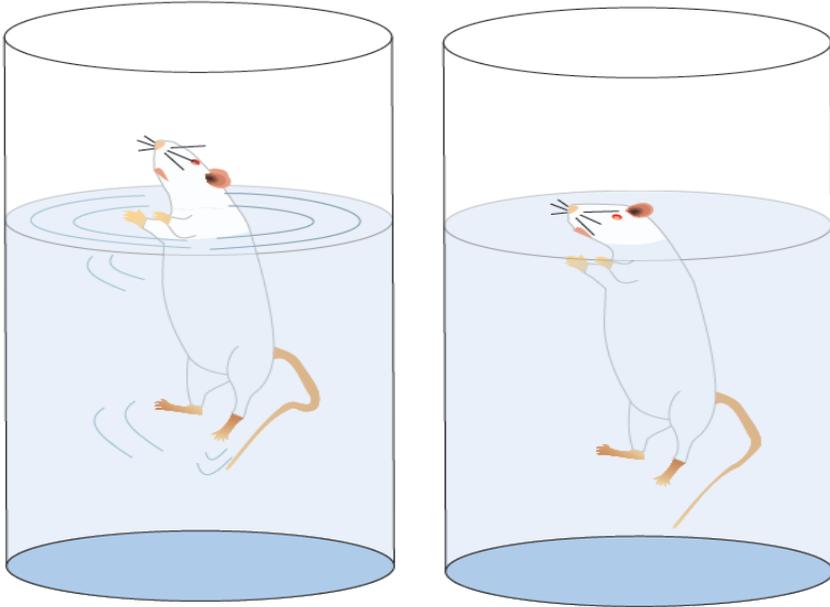


Figura 10 -Teste de nado forçado. Fonte: do autor, 2017.

3.11 CURVA DE KAPLAN MEIER

Tento em vista que os pacientes com meningite ocasionada pela *E.coli* apresentam alta taxa de mortalidade, foi buscado levantar a sobrevivência dos animais, que foi analisada através da curva de Kaplan-Meier incluído todos os animais infectados no momento da indução até 100 h após (totalidades de animais utilizados nos experimentos foram de 258 animais).

3.12 ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e para homogeneidade usando o teste de Levene. Se os dados foram normais e homogeneidade de variância confirmada, foram utilizados testes paramétricos; se os dados não cumpriram estas condições, foram utilizados os testes não-paramétricos.

Para as análises de citocinas, quimiocinas, BDNF os dados foram apresentados como mediana de 06 animais por grupo e foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. As comparações dentro dos grupos foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. Os resultados estatisticamente significativos foram indicados por $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$. Dados de estresse oxidativo, defesa enzimática e complexos da cadeia respiratória mitocondrial foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados pela análise de variância (ANOVA), seguido de teste post hoc Tukey. Para a curva de sobrevivência foi utilizado o teste de Kaplan-Meier.

Dados da tarefa de habituação ao campo aberto e nado forçado foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP) e as comparações dentro os grupos foram feitas utilizando-se teste t de Student pareado. Dados da tarefa de esquiva inibitória simples, esquiva inibitória de múltiplos treinos e reconhecimento de objetos foram apresentados como mediana e intervalo interquartil e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. As comparações dentro dos grupos foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. Em todas as comparações, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 20.0.

4. RESULTADOS

4.1 CURVA DE SOBREVIVENCIA

Na figura 11, pode ser observada a sobrevivência dos animais através da curva de Kaplan-Meier, incluindo todos os animais infectados desde o momento da infecção até 96 h.

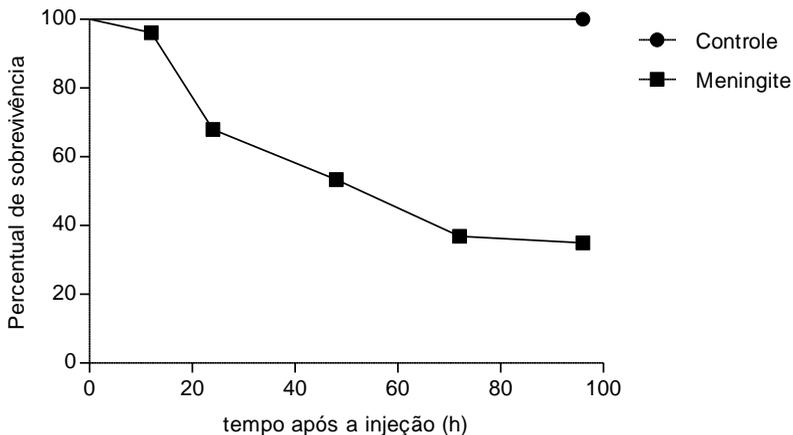


Figura 11 - Curva de sobrevivência, através da curva de Kaplan-Meier dos animais submetidos à meningite por *E. coli* K1.

Observou-se que os animais do grupo controle, induzidos com solução salina estéril, não apresentaram sinais clínicos da doença e não foi detectado crescimento de bactérias na cultura do LCR. A mortalidade iniciou em 12 h e 63,2% destes animais morreram até 72 h após a indução, após esse tempo os animais sobreviventes foram mortos.

4.2 NÍVEIS DE CITOCINAS, QUIMIOCIAS E BDNF

A figura 12 demonstra os níveis de TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, CINC-1 e BDNF no hipocampo de ratos Wistar neonatos submetidos à meningite por *E. coli* K1. Os níveis de TNF- α , IL-6 e CINC-1 aumentaram em todos os grupos meningites a partir das 6 h; os níveis de IL-4 e IL-10 aumentaram em 6, 24, 48 e 96 h; e os níveis de BDNF

aumentaram em 6, 24, 48 e 96 h, após a indução da meningite quando comparado com o grupo de controle.

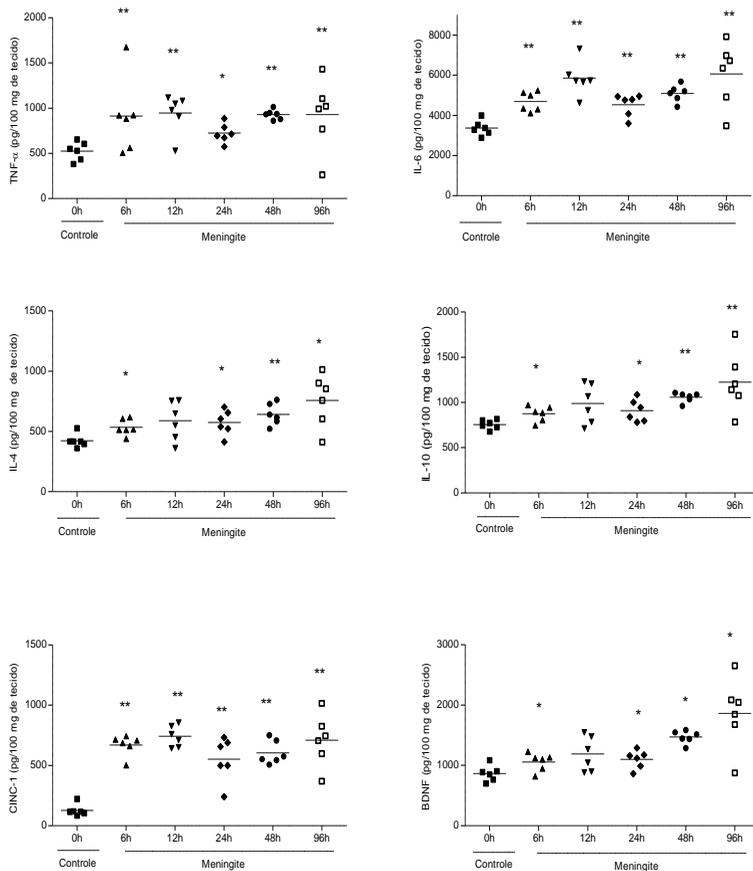


Figura 12 - Avaliação dos níveis de TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, CINC-1 e BDNF no hipocampo de ratos Wistar neonatos em 6, 12, 24, 48 e 96 h após a indução de meningite por *E. coli* K1. Os resultados foram expressos como mediana (linha horizontal) de 4-6 animais por grupo e foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. As comparações dentro dos grupos foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. Os símbolos *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 indicam resultados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle.

Na figura 13 podem ser observados os níveis de TNF- α no LCR dos animais submetidos à meningite por *E. coli*. Os níveis de TNF- α aumentaram em todos os tempos analisados no grupo meningite comparados com o grupo controle.

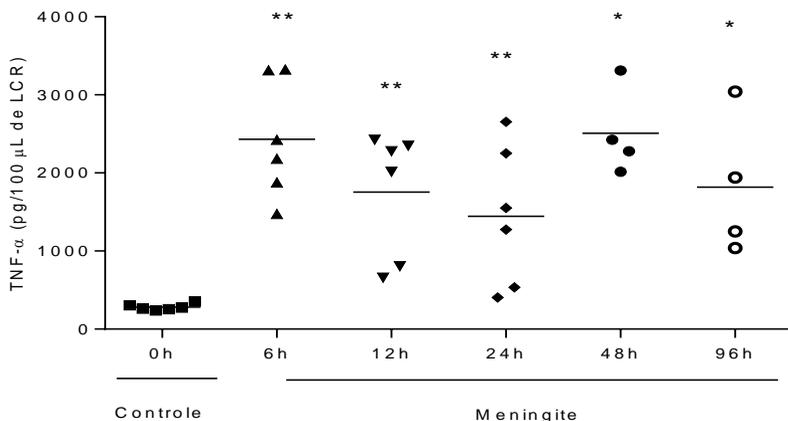


Figura 13 - Avaliação dos níveis de TNF- α no LCR de ratos Wistar neonatos em 6, 12, 24, 48 e 96 h após a indução de meningite por *E. coli* K1. Os resultados foram expressos como mediana (linha horizontal) de 4-6 animais por grupo e foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. As comparações dentro dos grupos foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. Os símbolos * p <0,05, ** p <0,01 indicam resultados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle.

Na figura 14, pode ser observado os efeitos da meningite neonatal sobre os níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, sulfidril, nitrito/nitrato, atividade da MPO, SOD e CAT no hipocampo e córtex frontal de ratos Wistar neonatos submetidos à meningite por *E. coli* K1. Os níveis de TBARS aumentaram no hipocampo nos grupos meningite em 24, 48 e 72 h após a indução. No córtex pré-frontal houve um aumento apenas em 12 h após a indução da meningite (figura 14 A). Em relação aos níveis de carbonilação de proteínas no hipocampo, houve um aumento em todos os tempos analisados nos grupos meningite quando comparado ao grupo controle. Entretanto, no córtex frontal não houve alterações significativas (figura 14 B). Os níveis de TMB no hipocampo diminuíram nos grupos meningite em 24 e 48 h e no córtex pré-frontal em 24, 48, 72 e 96 h após a indução da meningite por *E. coli* K1, quando comparado com o grupo controle (figura 14 C). Os níveis de

nitrito/nitrato aumentaram em 24, 48 e 72 h após a indução e não houve diferenças no córtex frontal (figura 14 D).

A atividade da MPO aumentou em 24, 48 e 72 h após a indução e no córtex frontal não houve diferença significativa (figura 14 E). A atividade de SOD diminuiu no hipocampo dos animais dos grupos meningite em 6, 12, 24, 48 e 72 h após a indução, comparado com o grupo controle, enquanto, no córtex frontal não houve diferença estatística (figura 14 F). A atividade da CAT não foi alterada em ambas as estruturas (figura 14G).

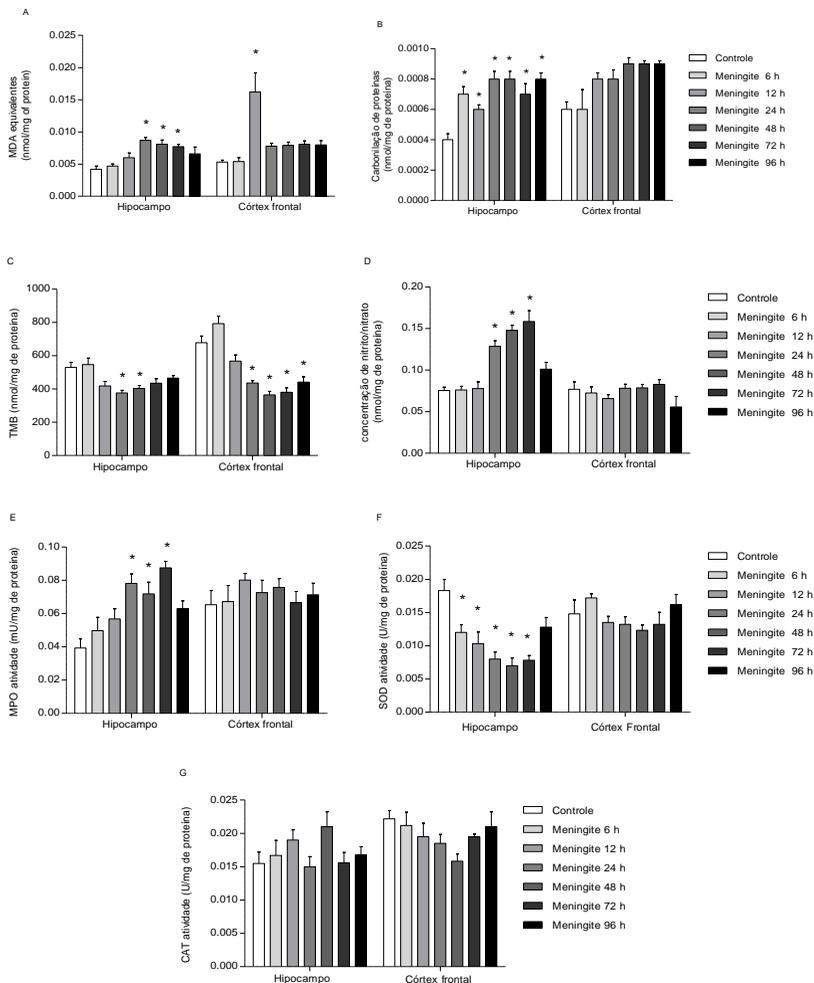


Figura 14 - Avaliação dos níveis de dano oxidativo e defesas antioxidante no hipocampo e córtex frontal de ratos Wistar neonatos em 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a indução de meningite por *E. coli* K1. Os níveis de MDA (A), carbonilação de proteínas (B), TMB (C), nitrito/nitrato (D), MPO (E) SOD (F) CAT (G) foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Tukey. O símbolo * $p < 0,05$, indica resultado estatisticamente significativo quando comparados ao grupo controle.

Foram analisadas as atividades dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial I, II, III e IV, conforme demonstrado na figura 15, em hipocampo e córtex frontal de ratos submetidos à meningite por *E. coli* K1. Os resultados demonstram que a atividade do complexo I foi aumentada em 72 h após a indução, no hipocampo comparado com o grupo controle (figura 15 A). Não se observou qualquer efeito significativo na atividade do complexo II (figura 15 B). No complexo III houve um aumento da atividade no grupo meningite 24 h após a indução da meningite no córtex frontal (figura 15 C) e o complexo IV apresentou aumento significativo de sua atividade no hipocampo nos grupos meningite em 24 e 72 h após a indução, enquanto, no córtex frontal houve uma diminuição da atividade desse complexo em 24 e 96 h após a indução quando comparados ao grupo controle (figura 15 D).

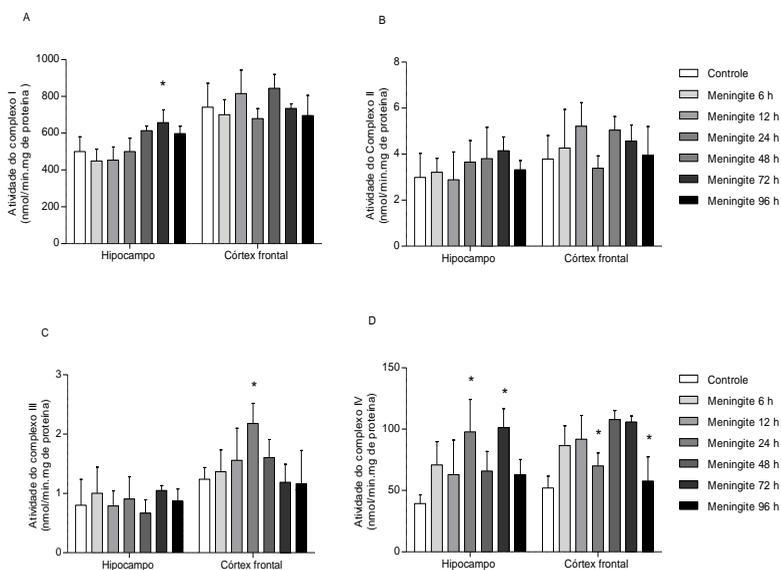
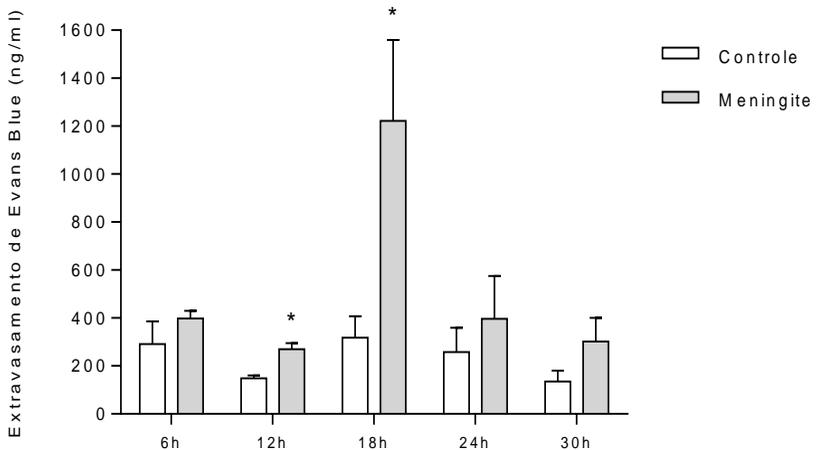


Figura 15 - Atividade dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial no hipocampo e córtex frontal de ratos Wistar neonatos em 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a indução de meningite por *E. coli* K1. Os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA, seguido de teste post hoc Tukey. O símbolo * $p < 0,05$, indica resultado estatisticamente significativo quando comparados ao grupo controle.

A figura 16 demonstra a avaliação da integridade da BHE no hipocampo e no córtex cerebral de ratos submetidos à meningite por *E. coli* K1, usando a técnica de extravasamento do corante azul de Evans. No hipocampo observou-se que a quebra da BHE ocorreu em 12 e 18 h (figura 16 A) e no córtex cerebral iniciou em 6, 12, 18 e 24 h após a indução de meningite por *E. coli* K1 (figura 16 B).

A



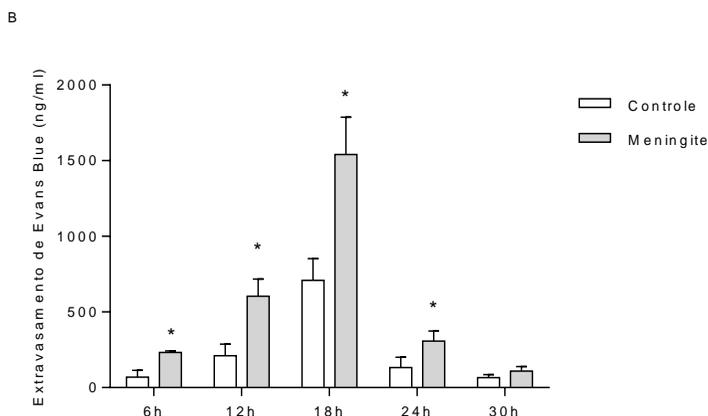


Figura 16 - Integridade da BHE no hipocampo (A) e córtex cerebral (B) em 6, 12, 18, 24 e 30 h após a indução da meningite por *E. coli* K1 no período neonatal. Os resultados são mostrados como média \pm DP de 6 animais por grupos, as diferenças entre os grupos foi avaliadas por ANOVA seguida de post-hoc Newman-Keuls. O símbolo * $p < 0,05$, indica resultado estatisticamente significativo quando comparados ao grupo controle.

4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

Sessenta dias após a indução da meningite, já em vida adulta, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de habituação ao campo aberto, esQUIVA inibitória, esQUIVA inibitória de múltiplos treinos e reconhecimento de objetos. No teste comportamental de habituação ao campo aberto, figura 17, houve diferença estatística no número de cruzamentos e levantamentos entre as sessões treino e teste dos animais pertencentes ao grupo controle, o que indica consolidação da memória de habituação nestes animais. Entretanto, no grupo meningite não houve diferença no número de cruzamentos e levantamentos entre as sessões treinos e teste, sugerindo dano na memória de habituação.

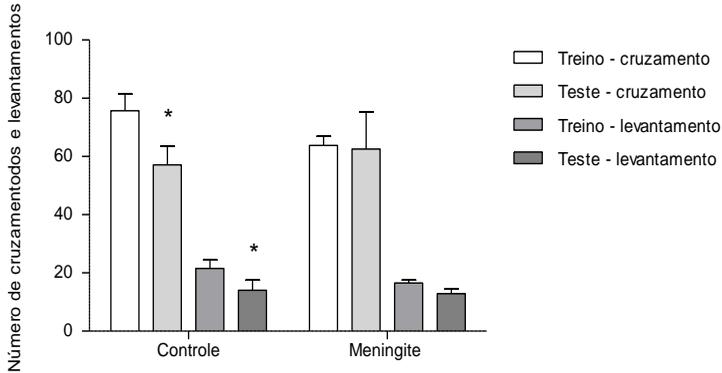


Figura 17 - Teste de habituação em campo aberto em ratos Wistar adultos submetidos à meningite por *E. coli* K1 no período neonatal. O número de cruzamentos e levantamentos foram relatados como média \pm DP de 10 animais por grupo e as comparações dentre os grupos foram realizadas com teste t de Student pareado. O símbolo * $p < 0,05$ indica diferença estatística quando comparado à sessão treino.

Na figura 18, apresentado o resultado do teste de esquiava inibitória, onde houve diferença significativa entre as sessões treino e teste no grupo controle, demonstrando a formação de memória aversiva neste grupo. No entanto, no grupo meningite, não houve diferença no tempo de latência entre as sessões treino e teste, demonstrando comprometimento da memória aversiva.

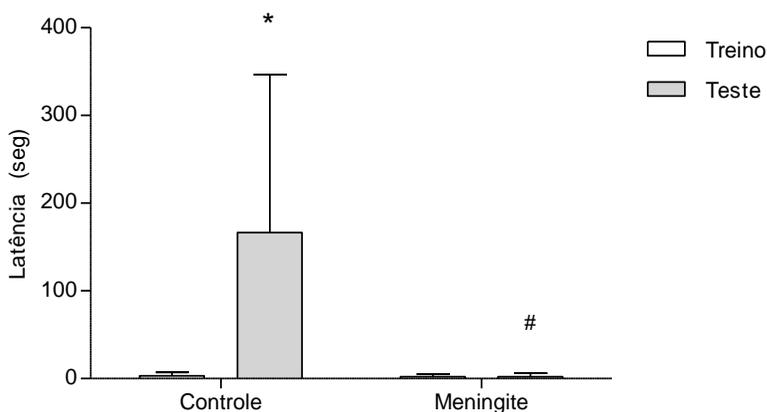


Figura 18 - Tarefa de esQUIVA inibitória em ratos Wistar adultos submetidos à meningite por *E. coli* K1 no período neonatal. Os dados foram relatados como mediana e intervalo interquartil e as comparações entre os grupos foram realizadas usando o teste de Mann-Whitney. As comparações dentro dos grupos foram analisadas com teste de Wilcoxon (n = 10 animais por grupo). Os símbolos * $p < 0,05$ indicam diferenças comparado com a sessão treino e # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

No teste de esQUIVA inibitória de múltiplos treinos, figura 19, houve um aumento significativo no número de tentativas de treino requerido para atingir o critério de aquisição (50 segundos sobre a plataforma) no grupo meningite quando comparado com o grupo controle (Figura 19 A). Os resultados desta tarefa sugerem que o grupo meningite necessitou mais estímulos elétricos para atingir o critério de aquisição, quando comparado com o grupo controle na sessão teste para aprender, o que indica prejuízo de aprendizagem. No teste de retenção, houve diferença entre as sessões treino e teste em ambos os grupos e houve diminuição do tempo de latência na sessão teste no grupo meningite quando comparado com o grupo controle (figura 19 B).

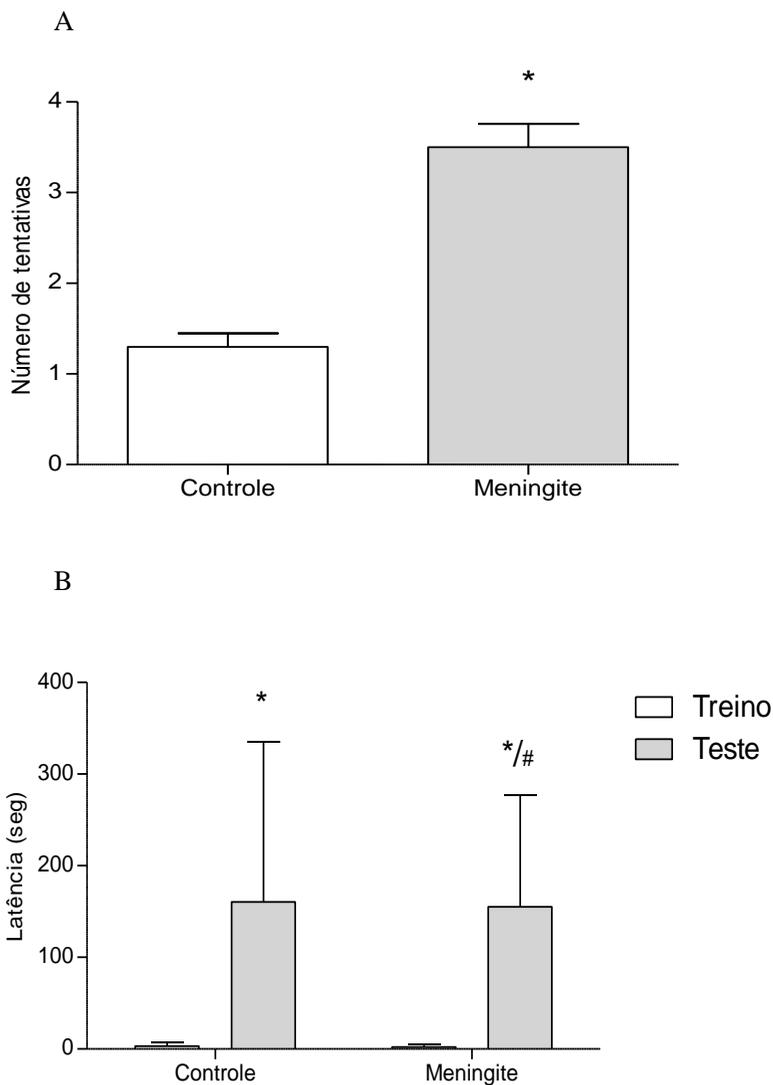


Figura 19 - Teste de esquiwa inibitória de múltiplos treinos em ratos Wistar adultos submetidos à meningite por *E. coli* K1 no período neonatal. Os dados são apresentados como mediana e intervalo

interquartil e as comparações entre os grupos foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney. As comparações dentro dos grupos foram analisadas com teste de Wilcoxon ($n = 10$ animais por grupo). Os símbolos * $p < 0,05$ comparado à sessão treino e # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Na tarefa de reconhecimento de objetos, demonstrada na figura 20, o grupo meningite e o grupo controle apresentaram um aumento do índice de reconhecimento no teste, quando comparado com o treino. Portanto, os grupos meningite e controle apresentaram retenção de memória de reconhecimento em longo prazo quando comparado com a sessão de treino.

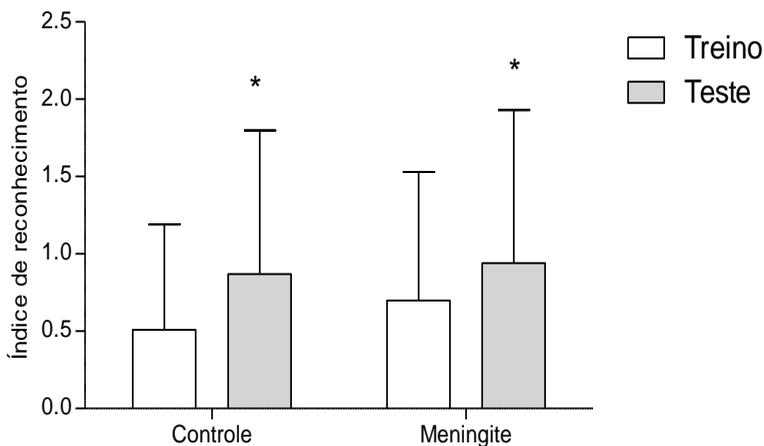


Figura 20 - Teste de reconhecimento de objetos novos em ratos Wistar adultos submetidos à meningite por *E. coli* K1 no período neonatal. Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil e as comparações entre os grupos foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney. As comparações dentro dos grupos foram analisadas com teste de Wilcoxon ($n = 10$ animais por grupo). O símbolo * $p < 0,05$ comparados à sessão treino.

A figura 21 demonstra o teste de nado forçado. Não houve diferenças no tempo de imobilidade no grupo meningite quando

comparado ao grupo controle, sugerindo ausência de comportamento do tipo depressivo.

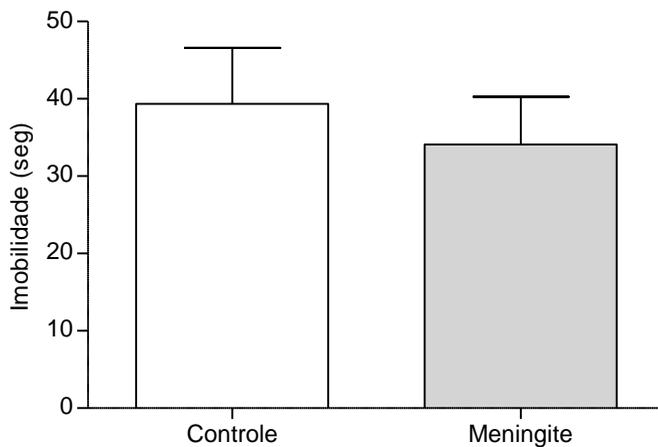


Figura 21 - Teste de nado forçado em ratos Wistar adultos submetidos à meningite por *E. coli* K1 no período neonatal. O tempo de imobilidade foi relatado como média \pm DP de 10 animais por grupo e as comparações dentre os grupos foram realizadas com teste *t de Student* pareado.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliada a influência da meningite neonatal induzida por *E. coli* K1 sobre o perfil de citocinas, quimiocina, níveis de BDNF no hipocampo, em 6, 12, 24, 48 e 96 horas e no LCR os níveis de TNF- α . Bem como, níveis de equivalentes MDA, formação de proteínas carbonil, sulfidrilas, nitrito/nitrato, atividade da MPO, SOD, CAT em 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h no hipocampo e córtex frontal de ratos após a indução da meningite. Verificou-se a atividade dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial e integridade da BHE no hipocampo e córtex frontal. Além disso, foi avaliada a memória de habituação e aversiva, de reconhecimento de novos objetos e comportamento depressivo em ratos adultos submetidos à meningite por *E. coli* K1 no período neonatal.

O percentual de animais que sobreviveram segundo a curva de Kaplan-Meier, que incluiu todos os animais desde o momento da indução bacteriana foi de 36,8%. Estes dados estão de acordo com a literatura que demonstra alta mortalidade em países em desenvolvimento, que pode alcançar aproximadamente 50% de mortalidade mesmo com o uso de antimicrobianos (Molyneux et al., 2002; Mook-Kanamori et al., 2011). A meningite bacteriana alcança 100% de mortalidade em 72 horas na ausência de antibioticoterapia (Kim, 2010). Com os dados do presente estudo, pode se fazer uma relação com o estudo de Gaschignard et al., (2012), o qual observou que o principal patógeno envolvido com a meningite neonatal é a bactéria *E. coli* K1 que leva a uma alta taxa de mortalidade variando entre 15% a 40% dos casos.

Verificou-se no presente estudo que os níveis de TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 e CINC-1 aumentaram no hipocampo desde as primeiras 6 horas até 96 horas após a indução da meningite. Estes dados estão de acordo com resultados já encontrados por nosso grupo de pesquisa, em que se verificou que CINC-1, IL-1 β e IL-6 foram aumentados em 6 h e TNF- α em 24 horas após a indução de meningite neonatal por *S. agalactiae* (Barichello et al., 2011). Em outro estudo, os níveis de CINC-1, IL-1 β e TNF- α foram

aumentados no hipocampo e os níveis de CINC-1, IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α foram aumentados no córtex frontal de neonatos submetidos à meningite pneumocócica.

Além disso, os níveis de IL-4 e IL-10 aumentaram em animais sobreviventes à meningite pneumocócica no período neonatal (Barichello et al., 2012a). Baggiolini e colaboradores (1994) verificaram elevados níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 na fase inicial da infecção no LCR antes do aumento de leucócitos, demonstrando que estas citocinas foram produzidas a partir de células normalmente presentes no SNC, tais como células endoteliais, células da microglia, e astrócitos, o que indica que esses desempenham um importante papel na fase inicial da reação inflamatória local (Baggiolini et al., 1994).

Em estudo anterior, observou-se que os níveis de TNF- α e CINC-1 aumentaram no hipocampo nas primeiras 6 h após a indução da meningite pneumocócica em ratos Wistar adultos, sendo que os níveis altos de TNF- α pode desencadear a ativação de vias apoptóticas no SNC (Barichello et al., 2012b). Verificou também em outro estudo que os níveis de CINC-1 aumentaram primeiro no plasma jugular quando comparado com o plasma arterial após a indução da meningite pneumocócica, sugerindo sua produção no cérebro (Barichello et al., 2012c). CINC-1 também parece ser relevante na fase inicial da meningite bacteriana devido a sua capacidade de promover a migração de leucócitos. Esta resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência em resposta à infecção, mas também tem a capacidade de causar danos consideráveis (Konsman et al., 2007).

Devido à produção de citocinas, os leucócitos polimorfonucleares são atraídos a partir da corrente sanguínea e produzem quantidades elevadas de ERO (Kastenbauer et al., 2002b). Estes causam disfunção da BHE, disfunção mitocondrial que leva à liberação de fatores de indução de apoptose para o citosol (Mitchell et al., 2004). Em um estudo com 54 recém-nascidos, 30 destes pacientes tiveram meningite e 24 foram utilizados como o grupo controle, verificou-se um aumento dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no LCR de todos os recém-nascidos com meningite (Krebs et al., 2005).

O BDNF é uma proteína que juntamente com seus receptores, é expressa amplamente no SNC e desempenha um papel importante na organização de redes neuronais e neuroplasticidade sináptica, especialmente no hipocampo. Sendo encontrada em uma variedade de modelos animais e, aparentemente, em seres humanos (Izquierdo e Medina, 1997). Esta neurotrofina também controla a morte celular neuronal no desenvolvimento e é crucial na diferenciação e sobrevivência neuronal (Huang et al., 2008). O BDNF liberado por células do sistema imunológico é bioativo (Kerschensteiner et al., 1999) e tem efeitos neuroprotetores em neurônios após a indução de meningite bacteriana (Li et al., 2007).

No presente estudo os níveis de BDNF foram aumentados em 6, 24, 48 e 96 h após a indução da meningite, com uma progressão nas últimas horas avaliadas. Estes resultados estão de acordo com estudo realizado por Barichello et al., (2014), onde os níveis de BDNF aumentaram no hipocampo em 24 horas e no córtex frontal em 6, 12, 24 e 48 horas em animais submetidos a meningite bacteriana por *K. pneumoniae* (Barichello et al., 2014b). Morichi e colaboradores, também demonstraram elevados níveis de BDNF no soro de pacientes com infecções no SNC, e a elevação foi particularmente notável em pacientes com meningite bacteriana (Morichi et al., 2012). O BDNF possui diversas funções no SNC como, neurogênese, diferenciação e sobrevivência neuronal e estão envolvidas em vias moleculares que são relevantes para a cognição, aprendizagem e processos de memória (Allen et al., 2013; Martinez-Levy e Cruz-Fuentes, 2014).

É importante notar o duplo papel desempenhado pelo estresse oxidativo durante as infecções. Os radicais livres protegem contra micro-organismos invasores, por outro lado eles também podem causar danos nos tecidos resultando em inflamação (Pohanka, 2013). Durante a meningite bacteriana como parte de defesa do hospedeiro neutrófilos, macrófagos e micróglia são ativados, aumentando a formação de ERO, sendo assim dirigida contra s micro-organismos (Aycicek et al., 2006). Estudos sugerem fortemente que as ERO parecem desempenhar

um papel importante na fisiopatologia da meningite bacteriana, uma vez que o tratamento com vários eliminadores de radicais/ou antioxidantes inibem a perda neuronal em meningite experimental (Leib et al., 1996; Auer et al., 2000).

No presente estudo, foi observado um aumento dos níveis de peroxidação lipídica e dos níveis de carbonilação de proteína como marcadores de estresse oxidativo no hipocampo dos animais após indução por *E. coli* K1. Foi observado também diminuição de sulfidrila, aumentos simultâneos nas concentrações de nitrato/nitrato nos grupos meningite. Além do aumento do estresse oxidativo a meningite bacteriana está associada a um sistema de redução de enzimas antioxidantes. No estudo foi observado a atividade aumentada de MPO no hipocampo após 24 horas da indução de *E. coli* K1, com diminuição da atividade da SOD a partir de 6 h após a inoculação. Entretanto, não houve diferença na alteração da enzima CAT entre o grupo controle e meningite. Os resultados do estresse oxidativo e da defesa enzimática demonstraram claramente o papel das ERO e dos níveis de antioxidantes durante a meningite experimental induzida por *E. coli* K1. A MPO liberada no espaço extracelular expressa efetiva atividade pró-oxidante. Miric e colaboradores (2010) demonstraram, no soro, que a atividade de MPO e peroxidação lipídica permaneceu elevada em pacientes com meningite bacteriana ao longo da doença (Miric et al., 2010).

Estudos mostram a ação das ERO e ERN nas alterações em modelo de meningite bacteriana, e essas ações parecem desempenhar um papel central no desenvolvimento de complicações associadas à meningite, podendo assim, ser associados à ativação imune, rompimento da BHE, insuficiência vascular e lesão neuronal (Klein et al., 2006). Estas ações também foram verificadas no presente estudo com neonatos submetidos à meningite por *E.coli* K1.

Neste estudo foi investigada a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial na meningite experimental induzida por *E. coli* K1, sabe-se que os danos oxidativos mitocondriais contribuem para diferentes condições

fisiopatológicas (Murphy, 2016). Através da fosforilação oxidativa, a maioria das células obtém energia e este processo requer a ação de vários complexos de enzimas localizadas em uma estrutura especial da membrana mitocondrial interna, a cadeia respiratória mitocondrial. Anteriormente, foi evidenciado o papel dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em ratos submetidos à meningite pneumocócica (Barichello et al., 2010b).

Os resultados deste estudo revelaram que a atividade do complexo I no hipocampo, do complexo III no córtex frontal e do complexo IV no hipocampo e córtex frontal, aumentou significativamente no grupo meningite induzida por *E. coli* K1. Contudo, a atividade do complexo II não se alterou no grupo meningite. Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados em outros estudos de Barichello et al., (2010, 2013), em que os animais submetidos ao modelo experimental de meningite por *S. pneumoniae* e *K. pneumoniae*, apresentaram aumento da atividade do complexo I e II no hipocampo desses animais, após a indução da meningite (Barichello et al., 2010b; Barichello et al., 2013b). Alguns autores afirmam que uma das hipóteses poderia ser o desequilíbrio entre a geração de ERO e as defesas antioxidantes do organismo, levando ao estresse oxidativo, comprometendo o sistema de fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de elétrons, principalmente no complexo I, que é mais vulnerável aos danos ocasionados (Adam-Vizi, 2005; Navarro e Boveris, 2007).

Os radicais livres combinados com a liberação de uma variedade exacerbada de mediadores inflamatórios podem agir direta ou indiretamente e influenciar a função mitocondrial e a produção de energia (James e Murphy, 2002). Em estudos realizados com modelo de sepse, observou-se que a eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial é comprometida devido ao dano na membrana mitocondrial e ao comprometimento da função do complexo citocromo c. Consequentemente, os elétrons, que normalmente fluem através da cadeia de transporte de elétrons são desviados para o ciclo-Q gerando superóxido (Crouser, 2004).

A citocina TNF- α , outras citocinas, quimiocinas, atividade MPO e estresse oxidativo podem estar envolvidos na quebra da BHE. Kim et al., (2012) verificaram que os níveis de TNF- α no LCR estava relacionada com a passagem de albumina circulante através da BHE, cerca de 20 horas após a indução da meningite bacteriana intracisternal (Kim et al., 2012). No presente estudo, a quebra da BHE ocorreu em 12 e 18 horas no hipocampo e em 6, 12, 18 e 24 horas no córtex cerebral após a indução meningite por *E. coli* K1. Em estudos anteriores com meningite neonatal experimental, a disfunção da BHE no hipocampo iniciou em 18 horas e no córtex cerebral às 12 horas após a meningite pneumocócica (Barichello et al., 2012a).

Na meningite neonatal induzida por *S. agalactiae*, a disfunção iniciou em 12 horas em ambas as estruturas cerebrais (Barichello et al., 2012d). Infecções neonatais bacterianas no SNC são graves e a interferência com a complexa rede de citocinas, quimiocinas, oxidantes e outros mediadores inflamatórios, podem ser responsáveis pela quebra da BHE e tendem a agravar a doença bem como, em longo prazo, podem acarentar em danos no SNC (Tyler, 2008).

Estudos de Bonacorsi e Bingen, (2005) e Allocati et al., (2013) mostram que aproximadamente 50% dos pacientes sobreviventes à meningite apresentam sequelas neurológicas, como alterações de comportamento e prejuízos na aprendizagem. Esse evento também é observado em animais, pois estudos de Barichello et al., (2005; 2010; 2012; 2014) e Tuon et al., (2008) indicaram dano cognitivo de animais a longo prazo em modelos de doenças infecciosas, principalmente dano na memória de habituação. A memória não associativa está relacionada com a habituação, neste teste ocorre a redução da força de uma resposta a um estímulo inócua, ou melhor, no presente estudo, o grupo controle reconheceu o ambiente anterior, reduzindo assim a atividade locomotora e exploratória na sessão teste. Porém os animais do grupo meningite não obtiveram os mesmos resultados, estímulo caracterizando um déficit na memória de habituação.

A esquia inibitória permite a determinação precisa do momento após o aprendizado. No presente estudo, os animais

com meningite tiveram dano na memória aversiva. Em outros modelos animais de infecção (sepsis) demonstram comprometimento cognitivo em ratos sobreviventes, principalmente avaliados com o teste de esquiwa inibitória nos tempos de 10, 30 dias após a sepsis (Comin et al., 2011). Os mecanismos associados a essas alterações não são completamente elucidado, assim, os modelos animais podem ser usados para resolver essas limitações. Neste estudo, essas alterações comportamentais encontradas podem ser relacionadas com o primeiro dano (aumento de citocinas e quebra BHE), ou melhor, a resposta inflamatória gerada pela infecção causada pela *E. coli* K1. Estudo de Hoffman et al., (2007) demonstrou que houve comprometimento cognitivo (memória aversiva) em camundongos sobreviventes de meningite e esses dados foram correlacionados com alterações no hipocampo.

Em trabalhos anteriores, já foi demonstrado que ratos adultos sobreviventes à meningite pneumocócica apresentaram dano de aprendizagem e memória 10 dias após a indução (Barichello et al., 2010c). Nossos resultados corroboram com estudo de Barichello et al., (2014), em que ratos recém-nascidos submetidos à meningite pneumocócica apresentaram déficit de comportamento na idade adulta (Barichello et al., 2014a).

Sequelas em longo prazo em pacientes que tiveram meningite neonatal são frequentes, particularmente sequelas neurosensoriais (14-17%) e neurológicas (10-17%) (Durrmeyer et al., 2012). Um total de 1.433 crianças sobreviventes de meningite bacteriana foram avaliadas para sequelas cognitivas após o momento da alta. Destas, 49,2% foram referidas como tendo uma ou mais sequelas em longo prazo, 45% apresentaram sequelas comportamentais e/ou intelectuais, 6,7% perda auditiva e 14,3% déficits neurológicos (Chandran et al., 2011). Um estudo posterior com um total de 111 crianças que tiveram meningite neonatal foi comparado com 113 pacientes controles com idade média de 9-10 anos. Não houve diferença significativa no quociente de inteligência entre os casos de *E. coli* e *S. agalactiae*, porém o quociente médio de inteligência dos casos de meningite (88,8%) foi significativamente menor que o dos controles

hospitalares (Stevens et al. 2003). Uma das causas do comprometimento cognitivo podem ser a reação inflamatória que envolve as meninges e o espaço subaracnóide e também os vasos parênquima cerebral, contribuindo para o desenvolvimento de danos neuronais (Sellner et al., 2010).

Em estudo epidemiológico foi evidenciado que pacientes sobreviventes à meningite bacteriana, principalmente as crianças, apresentaram disfasia, déficit de memória, cognição, distúrbio de atenção e falhas no desenvolvimento (Kim, 2010). Mesmo com a utilização antimicrobianos, as sequelas deixadas pela meningite bacteriana são frequentes (Bottomley et al., 2012).

A compreensão da fisiopatologia da meningite bacteriana se baseia principalmente em observações de casos clínicos e estudos em modelos animais. Em casos de autópsia de meningite bacteriana, lesões no SNC foram caracterizadas por apoptose hipocampal no giro dentado (Nau et al., 1999); os mesmos danos foram observados em modelos animais, com um pico de apoptose em 30 horas após a infecção em ratos infantis (Grandgirard et al., 2007c). Esse tipo de dano foi associado com deficiências de aprendizagem e memória em modelos experimentais de meningite (Grandgirard e Leib, 2010).

Neste estudo também foi realizado o teste de nado forçado, que é frequentemente usado em modelo animal para avaliar comportamentos semelhantes à depressão (Porsolt et al., 1977). O método se baseia na observação do animal, que é forçado a nadar em uma situação em que não há escapatória e, após um período inicial de atividade intensa, deixam de se movimentar, fazendo apenas movimentos para manter sua cabeça fora da água. Esta imobilidade comportamental indica desespero e a percepção do animal da impossibilidade de escapar (Gaire e Lim, 2014). Em estudo com modelo animal de depressão houve alterações nesse teste (Garcia et al., 2009), porém em nosso estudo, não foi observado alterações significativas no tempo de imobilidade quando comparado grupo meningite e grupo controle, levando a concluir que os animais não apresentaram sintomas semelhantes à depressão na vida adulta quando submetidos à meningite por *E. coli* K1 no período neonatal.

Estudos com modelos de meningites mostram que não há alteração significativa entre as sessões de treino e teste do teste de reconhecimento de objeto (Barichello et al., 2005; 2010; 2012a; 2014). Curiosamente, no teste de reconhecimento de objeto, foi observado que o grupo meningite teve um aumento significativo no índice de reconhecimento na sessão teste, quando comparado com o treino, indicando que o grupo meningite apresentou retenção de memória de reconhecimento em longo prazo. Esse teste tem o mesmo princípio de habituação, o animal, assim como as pessoas, tem a tendência de explorar sempre o objeto novo (De Lima et al., 2005). Esse achado pode ser relacionado com a elevação dos níveis de BDNF nos momentos iniciais, pois o mesmo desempenha um papel fundamental na plasticidade neuronal e na memória, agindo nos principais processos dependentes de estímulo externo (objeto de reconhecimento), isto é, aprendizado, experiências e memórias (Frey et al., 2006). O BDNF vem sendo pesquisado em diversas doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, principalmente a relação com as funções fisiológicas como formação de memória, plasticidade neuronal, controle da função sináptica bem como sua expressão no SNC promove ações de sobrevivência em neurônios do hipocampo e córtex diminuindo o dano na memória dos animais (Griesbach et al., 2008; Saha et al., 2006).

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo podem ajudar a compreender melhor a fisiopatologia da doença, a resposta pró-inflamatória do hospedeiro, a interferência da complexa rede de citocinas e quimiocinas e comprometimento cognitivo na idade adulta. Os resultados deste estudo, demonstram que, durante a meningite, houve um aumento de peroxidação lipídica, carbonilização de proteína, citocinas, quimiocinas, BDNF e dano a BHE, demonstrando que infecções bacterianas neonatais são graves e provocam danos comportamentais de aprendizagem e memória de habituação, aversiva e reconhecimento de novos objetos através dos testes comportamentais.

Desta forma este modelo animal de meningite é importante para estudar as sequelas cognitivas e comportamentais em longo prazo ocasionadas pela meningite no período neonatal. Novos estudos são necessários para um melhor entendimento sobre a fisiopatologia desta complexa doença. Portanto, esforços para compreender e apoiar a capacidade reparadora do hospedeiro, uma área que até agora tem recebido pouca atenção, pode ser tão importante quanto desvendar os mecanismos que levam a danos.

REFERENCIAS

- Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*: Elsevier Health Sciences Brazil; 2012.
- Abdelmoez AT, Zaky DZ, Maher AM. Role of cerebrospinal fluid IL-8 as a marker for differentiation between acute bacterial and aseptic meningitis. *J Egypt Soc Parasitol*. 2014;44(1):205-10.
- Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(9-10):1140-9.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
- Akpede GO, Abiodun PO, Ambe JP, Jacob DD. Presenting features of bacterial meningitis in young infants. *Ann Trop Paediatr*. 1994;14(3):245-52.
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2001;302(2-3):141-5.
- Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther*. 2013;138(2):155-75.
- Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(12):6235-54.
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet*. 2005;365(9453):63-78.

Ansong AK, Smith PB, Benjamin DK, Clark RH, Li JS, Cotten CM, Mangum B, Garges HP, Benjamin DK, Jr. Group B streptococcal meningitis: cerebrospinal fluid parameters in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Early Hum Dev.* 2009;85(10 Suppl):19.

Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res.* 2005;97(6):512-23.

Auer M, Pfister LA, Leppert D, Tauber MG, Leib SL. Effects of clinically used antioxidants in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis.* 2000;182(1):347-50.

Aycicek A, Iscan A, Erel O, Akcali M, Selekc S. Total antioxidant/oxidant status in meningism and meningitis. *Pediatr Neurol.* 2006;35(6):382-6.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 1994;55:97-179.

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

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RdCG, Paula SOD, Rodrigues VP, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr.* 2010;23(4):629-43.

Barichello T, Belarmino E, Jr., Comim CM, Cipriano AL, Generoso JS, Savi GD, Stertz L, Kapczinski F, Quevedo J. Correlation between behavioral deficits and decreased brain-derived neurotrophic [correction of neurotrophic] factor in neonatal meningitis. *J Neuroimmunol.* 2010a;223(1-2):73-6.

Barichello T, dos Santos I, Savi GD, Florentino AF, Silvestre C, Comim CM, Feier G, Sachs D, Teixeira MM, Teixeira AL,

Quevedo J. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) levels in the brain and cerebrospinal fluid after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *Neurosci Lett*. 2009;467(3):217-9.

Barichello T, Fagundes GD, Generoso JS, Dagostin CS, Simoes LR, Vilela MC, Comim CM, Petronilho F, Quevedo J, Teixeira AL. Environmental enrichment restores cognitive deficits induced by experimental childhood meningitis. *Rev Bras Psiquiatr*. 2014a;36(4):322-9.

Barichello T, Fagundes GD, Generoso JS, Paula Moreira A, Costa CS, Zanatta JR, Simoes LR, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Carvalho Vilela M, Lucio Teixeira A. Brain-blood barrier breakdown and pro-inflammatory mediators in neonate rats submitted meningitis by *Streptococcus pneumoniae*. *Brain Res*. 2012a;1471:162-8.

Barichello T, Generoso JS, Silvestre C, Costa CS, Carradore MM, Cipriano AL, Michelon CM, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Vilela MC, Teixeira AL. Circulating concentrations, cerebral output of the CINC-1 and blood-brain barrier disruption in Wistar rats after pneumococcal meningitis induction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012c;31(8):2005-9.

Barichello T, Goncalves JC, Generoso JS, Milioli GL, Silvestre C, Costa CS, Coelho Jda R, Comim CM, Quevedo J. Attenuation of cognitive impairment by the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin in Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis. *BMC Neurosci*. 2013a;14(42):1471-2202.

Barichello T, Lemos JC, Generoso JS, Carradore MM, Moreira AP, Collodel A, Zanatta JR, Valvassori SS, Quevedo J. Evaluation of the brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor and memory in adult rats survivors of the neonatal meningitis by *Streptococcus agalactiae*. *Brain Res Bull*. 2012d;92:56-9.

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

Barichello T, Savi GD, Simões LR, Generoso JS, Fraga DB, Bellettini G, Daufenbach JF, Rezin GT, Scaini G, Streck EL. Evaluation of mitochondrial respiratory chain in the brain of rats after pneumococcal meningitis. *Brain Research Bulletin*. 2010b;82(5-6):302-7.

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. *J Neural Transm*. 2010c;117(7):819-26.

Barichello T, Simoes LR, Generoso JS, Carradore MM, Moreira AP, Panatto AP, Costa CS, Filho AS, Jeremias IC, Bez GD, Streck E. Evaluation of energetic metabolism in the rat brain after meningitis induction by *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Neuropsychiatr*. 2013b;25(2):95-100.

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

Basmaci R, Bonacorsi S, Bidet P, Biran V, Aujard Y, Bingen E, Bechet S, Cohen R, Levy C. *Escherichia Coli* Meningitis Features in 325 Children From 2001 to 2013 in France. *Clin Infect Dis*. 2015;61(5):779-86.

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. *Eur J Neurosci*. 2003;17(4):897-902.
- Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*. 1993;64(5 Suppl):456-60.
- Birchough GM, Johansson ME, Stabler RA, Dalgakiran F, Hansson GC, Wren BW, Luzzio JP, Taylor PW. Altered innate defenses in the neonatal gastrointestinal tract in response to colonization by neuropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2013;81(9):3264-75.
- Bonacorsi S, Bingen E. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. *Int J Med Microbiol*. 2005;295(6-7):373-81.
- Bottomley MJ, Serruto D, Safadi MA, Klugman KP. Future challenges in the elimination of bacterial meningitis. *Vaccine*. 2012;30(30):099.
- Brandt CT. Experimental studies of pneumococcal meningitis. *Dan Med Bull*. 2010;57(1).
- Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):467-92.
- Camacho-Gonzalez A, Spearman PW, Stoll BJ. Neonatal Infectious Diseases: Evaluation of Neonatal Sepsis. *Pediatric Clinics of North America*. 2013;60(2):367-89.
- Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996;328(2):309-16.

Celik N, Tanir G, Aydemir C, Tuygun N, Zorlu P. [Differential diagnosis of bacterial and viral meningitis in childhood acute meningitis: a statistical model]. *Mikrobiyol Bul.* 2007;41(1):63-9.

Chandran A, Herbert H, Misurski D, Santosham M. Long-term sequelae of childhood bacterial meningitis: An underappreciated problem. *Pediatric Infectious Disease Journal.* 2011;30(1):3-6.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420(6917):885-91.

Crouser ED. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion.* 2004;4(5-6):729-41.

Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature.* 2010;468(7323):562-6.

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. *Behav Brain Res.* 2005;156(1):139-43.

de Louvois J, Halket S, Harvey D. Neonatal meningitis in England and Wales: sequelae at 5 years of age. *Eur J Pediatr.* 2005;164(12):730-4.

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

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

Della FP, Abelaira HM, Reus GZ, Santos MA, Tomaz DB, Antunes AR, Scaini G, Morais MO, Streck EL, Quevedo J. Treatment with tianeptine induces antidepressive-like effects and alters the neurotrophin levels, mitochondrial respiratory chain and cycle Krebs enzymes in the brain of maternally deprived adult rats. *Metab Brain Dis.* 2013;28(1):93-105.

Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology.* 1995;121(1):66-72.

Dinarello CA. Interleukin-1beta. *Crit Care Med.* 2005;33(12 Suppl):S460-2.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.

Durrmeyer X, Cohen R, Bingen E, Aujard Y. [Therapeutic strategies for *Escherichia coli* neonatal meningitis]. *Arch Pediatr.* 2012;19(3):71288-5.

Ehrenstein BP, Salzberger B, Gluck T. [New developments in the diagnosis and therapy of acute bacterial meningitis]. *Med Klin.* 2005;100(6):325-33.

Einat H, Clenet F, Shaldubina A, Belmaker RH, Bourin M. The antidepressant activity of inositol in the forced swim test involves 5-HT(2) receptors. *Behav Brain Res.* 2001;118(1):77-83.

Etiology and clinical signs of serious infections in young infants in developing countries: a WHO collaborative study. *Pediatr Infect Dis J.* 1999 Oct;18(10 Suppl):S1-69.

Faria SM, Farhat CK. [Bacterial meningitis - diagnosis and treatment]. *J Pediatr*. 1999;75(1):S46-56.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 1985;153(1):23-36.

Furyk JS, Swann O, Molyneux E. Systematic review: neonatal meningitis in the developing world. *Trop Med Int Health*. 2011;16(6):672-9.

Gaire B, Lim D. Antidepressant effects of Radix et Caulis *Acanthopanax Santicosi* extracts on rat models with depression in terms of immobile behavior. *J Tradit Chin Med*. 2014;34(3):317-23.

Gaschignard J, Levy C, Bingen E, Cohen R. [Epidemiology of *Escherichia coli* neonatal meningitis]. *Arch Pediatr*. 2012;19(3):71286-1.

Gaschignard J, Levy C, Romain O, Cohen R, Bingen E, Aujard Y, Boileau P. Neonatal Bacterial Meningitis: 444 Cases in 7 Years. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(3):212-7.

Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(2):87-99.

Grandgirard D, Biffrare YD, Pleasure SJ, Kummer J, Leib SL, Tauber MG. Pneumococcal meningitis induces apoptosis in recently postmitotic immature neurons in the dentate gyrus of neonatal rats. *Dev Neurosci*. 2007a;29(1-2):134-42.

Grandgirard D, Leib SL. Strategies to prevent neuronal damage in paediatric bacterial meningitis. *Curr Opin Pediatr*. 2006;18(2):112-8.

Grandgirard D, Leib SL. Meningitis in neonates: bench to bedside. *Clin Perinatol*. 2010;37(3):655-76.

Grandgirard D, Schurch C, Cottagnoud P, Leib SL. Prevention of brain injury by the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin in experimental pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007b;51(6):2173-8.

Grandgirard D, Steiner O, Tauber MG, Leib SL. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol*. 2007c;114(6):609-17.

Gruol DL, Nelson TE. Purkinje neuron physiology is altered by the inflammatory factor interleukin-6. *Cerebellum*. 2005;4(3):198-205.

Grygorczuk S, Pancewicz S, Kondrusik M, Zajkowska J, Hermanowska-Szpakowicz T. [Chemokines in meningitis of different etiologies]. *Pol Merkur Lekarski*. 2001;10(56):117-21.

Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*: OUP Oxford; 2007.

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

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

Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1250:50-5.

Harada T, Harada C, Parada LF. Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. *Genes Dev.* 2007;21(4):367-78.

Harvey D, Holt DE, Bedford H. Bacterial meningitis in the newborn: a prospective study of mortality and morbidity. *Semin Perinatol.* 1999;23(3):218-25.

Haussen DC, Brandalise LN, Praetzel FA, Malysz AS, Mohrdieck R, Reichelt MA, Magalhaes CB, Grossi SP, Guardiola A. [Neonatal meningitis: related features]. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005;63(3A):625-31.

Heath PT, Okike IO, Oeser C. Neonatal meningitis: can we do better? *Adv Exp Med Biol.* 2011;719:11-24.

Hoffman JA, Mason EO, Schutze GE, Tan TQ, Barson WJ, Givner LB, Wald ER, Bradley JS, Yogev R, Kaplan SL. *Streptococcus pneumoniae* infections in the neonate. *Pediatrics.* 2003;112(5):1095-102.

Holt DE, Halket S, de Louvois J, Harvey D. Neonatal meningitis in England and Wales: 10 years on. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2001;84(2):F85-9.

Honda H, Warren DK. Central nervous system infections: meningitis and brain abscess. *Infect Dis Clin North Am.* 2009;23(3):609-23.

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

Houdouin V, Bonacorsi S, Brahim N, Clermont O, Nassif X, Bingen E. A uropathogenicity island contributes to the pathogenicity of *Escherichia coli* strains that cause neonatal meningitis. *Infect Immun*. 2002;70(10):5865-9.

Huang TL, Lee CT, Liu YL. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in patients with major depression: effects of antidepressants. *J Psychiatr Res*. 2008;42(7):521-5.

Irazuza J, Pretzlaff RK, DeCourten-Myers G, Zemlan F, Zingarelli B. Dexamethasone decreases neurological sequelae and caspase activity. *Intensive Care Med*. 2005;31(1):146-50.

Irazuza J, Pretzlaff RK, Zingarelli B. Caspases inhibition decreases neurological sequelae in meningitis. *Crit Care Med*. 2008;36(5):1603-6.

Irazuza 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):2553-9.

Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*. 1997;68(3):285-316.

James AM, Murphy MP. How mitochondrial damage affects cell function. *J Biomed Sci*. 2002;9(6 Pt 1):475-87.

Janeway C, Travers P. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 8 ed ed. New York 2014.

Jordan HT, Farley MM, Craig A, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Lynfield R, Thomas A, Zansky S, Gershman K, Albanese BA, Schaffner W, Schrag SJ. Revisiting the need for vaccine

prevention of late-onset neonatal group B streptococcal disease: a multistate, population-based analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(12):1057-64.

Kastenbauer S, Koedel U, Becker BF, Pfister HW. Oxidative stress in bacterial meningitis in humans. *Neurology*. 2002a;58(2):186-91.

Kastenbauer S, Koedel U, Becker BF, Pfister HW. Pneumococcal meningitis in the rat: evaluation of peroxynitrite scavengers for adjunctive therapy. *Eur J Pharmacol*. 2002b;449(1-2):177-81.

Kawai N, Kawanishi M, Okauchi M, Nagao S. Effects of hypothermia on thrombin-induced brain edema formation. *Brain Res*. 2001;895(1-2):50-8.

Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfield R. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med*. 1999;189(5):865-70.

Kim DW, Kilgore PE, Kim EJ, Kim SA, Anh DD, Dong BQ, Kim JS, Seki M. The Enhanced Pneumococcal LAMP Assay: A Clinical Tool for the Diagnosis of Meningitis Due to *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One*. 2012;7(8):e42954.

Kim KS. *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. *Infect Immun*. 2001;69(9):5217-22.

Kim KS. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(5):376-85.

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

Kim KS. Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(1):32-42.

Kim KS. Current concepts on the pathogenesis of *Escherichia coli* meningitis: implications for therapy and prevention. *Curr Opin Infect Dis.* 2012;25(3):273-8.

Kimura A, Namekata K, Guo X, Harada C, Harada T. Neuroprotection, Growth Factors and BDNF-TrkB Signalling in Retinal Degeneration. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9).

Klein M, Koedel U, Pfister HW. Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy? *Prog Neurobiol.* 2006;80(6):269-80.

Koedel U, Klein M, Pfister HW. New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23(3):217-23.

Koedel U, Pfister HW. Oxidative stress in bacterial meningitis. *Brain Pathol.* 1999;9(1):57-67.

Konsman JP, Drukarch B, Van Dam AM. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clinical Science.* 2007;112(1-2):1-25.

Korhonen TK, Valtonen MV, Parkkinen J, Vaisanen-Rhen V, Finne J, Orskov F, Orskov I, Svenson SB, Makela PH. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun.* 1985;48(2):486-91.

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

Kronfol Z, Remick DG. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*. 2000;157(5):683-94.

Ku LC, Boggess KA, Cohen-Wolkowicz M. Bacterial meningitis in infants. *Clin Perinatol*. 2015;42(1):29-45.

Leib SL, Heimgartner C, Bifrare YD, Loeffler JM, Taauber MG. Dexamethasone aggravates hippocampal apoptosis and learning deficiency in pneumococcal meningitis in infant rats. *Pediatr Res*. 2003;54(3):353-7.

Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA, Tauber MG. 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*. 1996;98(11):2632-9.

Leib SL, Täuber MG. PATHOGENESIS OF BACTERIAL MENINGITIS. *Infectious Disease Clinics of North America*. 1999;13(3):527-48.

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

Li L, Shui QX, Liang K, Ren H. Brain-derived neurotrophic factor rescues neurons from bacterial meningitis. *Pediatr Neurol*. 2007;36(5):324-9.

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

Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant

reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med*. 1995;18(2):153-8.

Martinez-Levy GA, Cruz-Fuentes CS. Genetic and epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system. *Yale J Biol Med*. 2014;87(2):173-86.

May M, Daley AJ, Donath S, Isaacs D. Early onset neonatal meningitis in Australia and New Zealand, 1992-2002. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2005;90(4):5.

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

Miric D, Katanic R, Kistic B, Zoric L, Miric B, Mitic R, Dragojevic I. Oxidative stress and myeloperoxidase activity during bacterial meningitis: effects of febrile episodes and the BBB permeability. *Clin Biochem*. 2010;43(3):246-52.

Mitchell L, Smith SH, Braun JS, Herzog KH, Weber JR, Tuomanen EI. Dual phases of apoptosis in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis*. 2004;190(11):2039-46.

Molyneux EM, Walsh AL, Forsyth H, Tembo M, Mwenechanya J, Kayira K, Bwanaisa L, Njobvu A, Rogerson S, Malenga G. Dexamethasone treatment in childhood bacterial meningitis in Malawi: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9328):211-8.

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

Morichi S, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Kawashima H. Expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in

cerebrospinal fluid and plasma of children with meningitis and encephalitis/encephalopathy. *Int J Neurosci*. 2012.

Muller N, Ackenheil M. Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1998;22(1):1-33.

Murphy MP. Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage. *Biochem Soc Trans*. 2016;44(5):1219-26.

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

Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292(2):4.

Nelson TE, Olde Engberink A, Hernandez R, Puro A, Huitron-Resendiz S, Hao C, De Graan PN, Gruol DL. Altered synaptic transmission in the hippocampus of transgenic mice with enhanced central nervous systems expression of interleukin-6. *Brain Behav Immun*. 2012;26(6):959-71.

Nizet VK, J.O. Bacterial sepsis and meningitis. In: Saunders E, editor. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 7 ed. Philadelphia 2011. p. 222.

Osrin D, Vergnano S, Costello A. Serious bacterial infections in newborn infants in developing countries. *Curr Opin Infect Dis*. 2004;17(3):217-24.

Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K, Stefonek KR, Albanese BA, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ.

Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA*. 2008;299(17):2056-65.

Pohanka M. Role of oxidative stress in infectious diseases. A review. *Folia Microbiol*. 2013;58(6):503-13.

Pong A, Bradley JS. Bacterial meningitis and the newborn infant. *Infect Dis Clin North Am*. 1999;13(3):711-33.

Porsolt RD. Animal model of depression. *Biomedicine*. 1979;30(3):139-40.

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):713-7.

Robbins JB, McCracken GH, Jr., Gotschlich EC, Orskov F, Orskov I, Hanson LA. Escherichia coli K1 capsular polysaccharide associated with neonatal meningitis. *N Engl J Med*. 1974;290(22):1216-20.

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 Res*. 2003;975(1-2):207-13.

Roos KL, van de Beek D. Bacterial meningitis. *Handb Clin Neurol*. 2010;96:51-63.

Rusconi F, Parizzi F, Garlaschi L, Assael BM, Sironi M, Ghezzi P, Mantovani A. Interleukin 6 activity in infants and children with bacterial meningitis. The Collaborative Study on Meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 1991;10(2):117-21.

- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1994;228(1):35-51.
- Schaper M, Gergely S, Lykkesfeldt J, Zbaren J, Leib SL, Tauber MG, Christen S. Cerebral vasculature is the major target of oxidative protein alterations in bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61(7):605-13.
- Scheld WM, Koedel U, Nathan B, Pfister HW. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury. *J Infect Dis*. 2002;1(186):S225-33.
- Sellner J, Tauber MG, Leib SL. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections. *Handb Clin Neurol*. 2010;96:1-16.
- Sen S, Duman R, Sanacora G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry*. 2008;64(6):527-32.
- Sharief MK, Ciardi M, Thompson EJ. Blood-brain barrier damage in patients with bacterial meningitis: association with tumor necrosis factor-alpha but not interleukin-1 beta. *J Infect Dis*. 1992;166(2):350-8.
- Smith SL, Hall ED. Mild pre- and posttraumatic hypothermia attenuates blood-brain barrier damage following controlled cortical impact injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1996;13(1):1-9.
- Somand D, Meurer W. Central nervous system infections. *Emerg Med Clin North Am*. 2009;27(1):89-100.
- Sriram K, O'Callaghan JP. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2007;2(2):140-53.

Stephens DS. Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31(1):3-14.

Stoll BJ. The global impact of neonatal infection. *Clin Perinatol.* 1997;24(1):1-21.

Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, Bizzarro MJ, Goldberg RN, Frantz ID, 3rd, Hale EC, Shankaran S, Kennedy K, Carlo WA, Watterberg KL, Bell EF, Walsh MC, Schibler K, Laptook AR, Shane AL, Schrag SJ, Das A, Higgins RD. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics.* 2011;127(5):817-26.

SVS. Situação da meningite pneumocócica no Brasil 2014; In: Saúde:

Thanabalasundaram G, Pieper C, Lischper M, Galla HJ. Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. *Brain Res.* 2010;6:1-10.

Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Med.* 2008;34(9):1724-31.

Tyler KL. Bacterial meningitis: an urgent need for further progress to reduce mortality and morbidity: *Neurology.* 2008 May 27;70(22 Pt 2):2095-6. doi: 10.1212/01.wnl.0000313158.07093.6a.; 2008.

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

van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med*. 2004;351(18):1849-59.

Varon E. [Epidemiology of acute bacterial meningitis in adult patients in France]. *Med Mal Infect*. 2009;39(7-8):432-44.

Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010;59(RR-10):1-36.

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

Wang S, Peng L, Gai Z, Zhang L, Jong A, Cao H, Huang SH. Pathogenic Triad in Bacterial Meningitis: Pathogen Invasion, NF-kappaB Activation, and Leukocyte Transmigration that Occur at the Blood-Brain Barrier. *Front Microbiol*. 2016;7(148).

Weisfelt M, de Gans J, van der Poll T, van de Beek D. Pneumococcal meningitis in adults: new approaches to management and prevention. *Lancet Neurol*. 2006;5(4):332-42.

Willis CL, Nolan CC, Reith SN, Lister T, Prior MJ, Guerin CJ, Mavroudis G, Ray DE. Focal astrocyte loss is followed by microvascular damage, with subsequent repair of the blood-brain barrier in the apparent absence of direct astrocytic contact. *Glia*. 2004;45(4):325-37.

Xie Y, Kim KJ, Kim KS. Current concepts on Escherichia coli K1 translocation of the blood-brain barrier. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004;42(3):271-9.

Zingarelli B. Nuclear factor-kappaB. Crit Care Med. 2005;33(12 Suppl):S414-6.

ANEXO A COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA



Resolução

O Comitê de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 04/2008/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 1153/95 (Lei Arouca), analisou o projeto abaixo.

Projeto: 11/2010

Pesquisador:

Tatiana Barichello

Título: "Avaliação das alterações neuroquímicas em ratos neonatos sobreviventes a meningite bacteriana induzida pela Escherichia Coli".

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com a Lei Federal 1153/95 – Lei Arouca. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado ao CEUA. Os membros do CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar o CEUA.

Criciúma, 16 de março de 2010.

Carina Rodrigues Boeck

Coordenadora do CEUA

ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 **Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC**
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP

Resolução
Comitê de Ética em Pesquisa, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/Ministério da Saúde analisou o projeto abaixo.

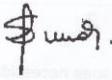
Projeto: 165/2008

Pesquisador:
Tatiana Barichello

Título: “Avaliação das alterações comportamentais em ratos neonatos sobreviventes a meningite bacteriana induzida pela *escherichia coli*”.

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada ao CEP. Os membros do CEP não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Criciúma, 14 de julho de 2008.


Mágada T. Schwalm
Coordenadora do CEP

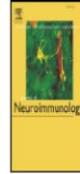
ANEXO C - ARTIGO PUBLICADO



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim



Neonatal *Escherichia coli* K1 meningitis causes learning and memory impairments in adulthood



Tatiana Barichello^{a,g,*}, Valdemira S. Dagostim^a, Jaqueline S. Generoso^a, Lutiana R. Simões^a,
Diogo Domingui^b, Cintia Silvestre^a, Monique Michels^d, Márcia Carvalho Vilela^e, Luciano K. Jornada^b,
Clarissa M. Comim^c, Felipe Dal-Pizzol^d, Antonio Lucio Teixeira^f, João Quevedo^{b,g}

^a Laboratório 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

^b Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

^c Laboratório de Neurociências Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, SC, Brazil

^d Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

^e Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil

^f Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^g Center for Experimental Models in Psychiatry, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The University of Texas Medical School at Houston, Houston, TX, USA

ANEXO D - ARTIGO SUBMETIDO

Temporal Changes of Oxidative Stress Markers in Escherichia coli K1 induced Experimental Meningitis in Neonatal Rat model

Vijayasree V Giridharan¹, Valdemira S Dagostin², Jhonata P Muniz², Jaqueline S Generoso², Lutiana R Simões², Drielly Florentino², Allan Collodel², Gislaine T Rezin³, Fabricia Petronilho³, João Quevedo^{1,4}, Tatiana Barichello^{1,2,4*}