

JAQUELINE DA SILVA GENEROSO

**TRATAMENTO COM VITAMINA B6 E B9 NA PREVENÇÃO
DE DANO OXIDATIVO E COGNITIVO EM MENINGITE
PNEUMOCÓCICA EXPERIMENTAL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana
Barichello

Co-orientadora: Profa. Dra. Josiane
Budni

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

G326t Generoso, Jaqueline da Silva .

Tratamento com vitamina B6 e B9 na prevenção de dano oxidativo e cognitivo em meningite pneumocócica experimental / Jaqueline da Silva Generoso ; orientadora : Tatiana Barichello ; coorientadora: Josiane Budni. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2017.

122 p. : il. ; 21 cm.

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

1. Vitamina B6 – Uso terapêutico. 2. Vitamina B9 – Uso terapêutico. 3. Meningite pneumocócica – Tratamento. 4. Estresse oxidativo. 5. Fator neurotrófico derivado do cérebro. 6. Barreira hematoencefálica. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1



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

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Jaqueline da Silva Generoso** sob o título “**TRATAMENTO ADJUVANTE COM VITAMINA B6 E B9 NA PREVENÇÃO DE DANO COGNITIVO EM MENINGITE PNEUMOCÓCICA EXPERIMENTAL**”, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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

Criciúma, SC, 07 de fevereiro de 2017.

Prof.ª Dra. ALEXANDRA MOPPI ZUGNO

Membro Relator – UNESC

Prof. Dr. FELIPE DAL PIZZOL

Membro Interno – UNESC

Prof.ª Dra. CRISTIANE DAMIANI TOMASI

Membro Externo – UNESC

Prof. Dr. EDUARDO MONGUILHOTT DALMARCO

Membro Externo – UFSC

Prof.ª Dra. Tatiana Barichello

Orientadora

Prof.ª Dra. Maria Inês da Rosa

Coordenadora do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Microbiologia Experimental e Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Dedico aos meus pais, Jureni da Silva Generoso e João Daniel Generoso, aos meus irmãos, Mônica da Silva Generoso e Daniel João Generoso, à minha cunhada Andréia Bez, meus sobrinhos Giulia e Gabriel, meu namorado Paulo de Luca Dalsasso. A vocês como todo amor e respeito por sempre compreenderem e reforçarem a importância desta etapa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os momentos difíceis que me tornaram mais forte e por todos os momentos de alegria que me fizeram sorrir.

Agradeço à minha família por fazer de mim uma pessoa capaz.

Agradeço imensamente à minha querida professora Tatiana Barichello, pela oportunidade e honra de ser sua aluna há tantos anos, por acreditar na minha capacidade, pelo carinho, amizade, pela confiança em mim depositada. Agradeço a ela por poder ter ao meu lado um modelo de profissional invejado por muitos e admirado por todos.

Agradeço aos meus colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia Experimental e de Neurociências: Allan Collodel, Amanda Steckert, Ana Paula Moreira, Caroline Serafim Dagostin, Cássia Pereira Rafael, Chayelle Raupp, Cristiano Faller, Diogo Dominguini, Drielly Florentino, Glauco Danielle Fagundes, Gustavo Sangiogo, Jéssica Goulart, Jhonata Pereira Muniz, Joana Barata, Luciano Jornada, Mira Dagostin, Paulo Eduardo Aveline, Silvio Renato Ribeiro Junior pelo carinho, atenção e dedicação na realização dos experimentos e por fazerem do laboratório um ambiente muito mais divertido e produtivo. Sem essa equipe não seria possível o término dessa tese.

À Bruna Pescador pelos inúmeros momentos de risadas e diversão, pela amizade e disponibilidade em ajudar em tudo.

Agradeço em especial minha colega e acima de tudo amiga Lutiana Roque Simões que tanto me ajudou nessa etapa, pela amizade de anos, pela confiança, carinho e dedicação. A ela agradeço as risadas, o companheirismo, a força, o conforto e a palavra amiga de ânimo.

Aos órgãos de fomento (CAPES, CNPq, FAPESC e UNESC), pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro necessário a execução dos experimentos que compõem esta tese.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A meningite pneumocócica é umas das mais complexas e graves infecções do sistema nervoso central (SNC) associada com distúrbios neurológicos e neuropsicológicos. Os compostos bacterianos são mediadores pró-inflamatórios que induzem a resposta imune e a degradação do triptofano através da via da quinurenina e podem contribuir para lesão do SNC associada com meningite bacteriana. A falta de uniformidade nos danos gera dificuldade para avaliar a severidade e o grau dos prejuízos neuronais, criando obstáculos para novas terapias no tratamento. A vitamina B6 atua como co-fator de enzimas que catalisam um grande número de reações envolvidas no metabolismo do triptofano, impedindo o acúmulo de intermediários neurotóxicos, podendo prevenir danos ao hospedeiro. A vitamina B9 desempenha um papel importante na neuroplasticidade e preservação da integridade neuronal e tem sido postulada como anti-depressiva, anti-maníaca e neuroprotetora. No presente estudo, foram avaliados os efeitos da vitamina B6 e B9 sobre a memória, parâmetros de estresse oxidativo, níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e integridade da barreira hematoencefálica (BHE) no hipocampo e córtex de ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica. Os animais receberam injeção na cisterna magna de 10 µL de suspensão de *Streptococcus pneumoniae* ou líquido cefalorraquidiano (LCR) artificial para o grupo controle. Grupos experimentais vitamina B6: controle/salina; controle/B6; meningite/salina e meningite/B6 e receberam 360 µL de vitamina B6 (600 mg/kg) ou salina estéril por via subcutânea em 0 e 18 horas após a indução da meningite. Grupos experimentais vitamina B9: controle/salina; controle/B9 10 mg/Kg; controle/B9 50 mg/Kg; meningite/salina, meningite/B9 10 mg/Kg e meningite/B9 50 mg/Kg. A vitamina B9 foi dissolvida em água e administrada via oral por gavagem iniciando o tratamento 18 horas após a indução e seguindo por 7 dias, 1 vez ao dia. Os parâmetros de estresse oxidativo foram avaliados em 24 horas e 10 dias após a indução da meningite. A integridade da BHE foi avaliada em 12, 18 e 24 horas após a indução. Os parâmetros comportamentais foram avaliados em 10 dias após a indução da meningite pelos testes de habituação ao campo aberto, esQUIVA inibitória e reconhecimento de objetos. Após, os animais foram mortos por decapitação para avaliação dos níveis de BDNF. Em 24

horas após a indução da meningite houve um aumento dos níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade da MPO no hipocampo e córtex pré-frontal; a atividade da SOD foi diminuída no hipocampo e aumentada no córtex pré-frontal e não houve diferença na atividade da CAT no hipocampo, enquanto que no córtex pré-frontal foi diminuída no grupo meningite/salina. Dez dias após a indução, os parâmetros de estresse oxidativo se mantiveram aumentados. Houve quebra da BHE em todos os tempos avaliados e o tratamento com ambas as vitaminas preveniu essa disfunção. Nos animais submetidos à meningite o tratamento com vitamina B6 e B9 preveniu o comprometimento cognitivo e aumentou os níveis de BDNF no hipocampo. O tratamento com vitamina B6 e B9 foi capaz de prevenir estresse oxidativo, quebra da BHE, aumentar os níveis de BDNF e prevenir danos cognitivos em ratos Wistar submetidos à meningite por *S. pneumoniae*.

Palavras-chave: Meningite, vitamina B6, vitamina B9, cognição, estresse oxidativo, BDNF.

ABSTRACT

Pneumococcal meningitis is one of the most complex and serious infections of the central nervous system (CNS) associated with neurological and neuropsychological disorders. Bacterial compounds are proinflammatory mediators that induce immune response and degradation of tryptophan via kynurenine and may contribute to CNS damage associated with bacterial meningitis. The lack of uniformity in the damages generates difficulty to evaluate the severity and the degree of the neuronal damages, creating obstacles for new therapies in the treatment. Vitamin B6 acts as a cofactor in the active sites of the enzymes that catalyze a large number of reactions involved in the metabolism of tryptophan, preventing the accumulation of neurotoxic intermediates and preventing damage to the host. Vitamin B9 plays an important role in neuroplasticity and preservation of neuronal integrity and has been postulated as antidepressant, anti-manic and neuroprotective. In the present study, the effects of vitamin B6 and B9 on memory, oxidative stress parameters, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and the blood-brain barrier (BBB) integrity in the hippocampus and cortex of adult Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis. The animals received either 10 μ L of artificial cerebrospinal fluid (CSF) for the control group or an equivalent volume of *Streptococcus pneumoniae* suspension. Experimental groups vitamin B6: control/saline; control/B6; meningitis/saline and meningitis/B6 and received 360 μ L of vitamin B6 (600 mg/kg) or sterile saline subcutaneously at 0 and 18 hours after meningitis induction. Experimental groups vitamin B9: control/saline; control/B9 10 mg/kg; control/B9 50 mg/kg; meningitis/saline, meningitis/B9 10 mg/kg; and meningitis/B9 50 mg/kg. Vitamin B9 was dissolved in water and administered orally via gavage by initiating treatment 18 hours after an induction and following for 7 days, 1 time per day. The parameters of oxidative stress were evaluated at 24 hours and 10 days after the meningitis induction. The BBB integrity was evaluated at 12, 18 and 24 hours after induction. The behavioral parameters were evaluated 10 days after the meningitis induction by open field, step-down inhibitory avoidance and object recognition tests. After, the animals were killed by decapitation for evaluation of BDNF levels. In 24 hours after the meningitis induction there was an increase in the MDA, protein

carbonylation, nitrite/nitrate levels and MPO activity in the hippocampus and prefrontal cortex; SOD activity was decreased in the hippocampus and increased in the prefrontal cortex and there was no difference in CAT activity in the hippocampus, whereas in the prefrontal cortex was decreased in the meningitis/saline group. Ten days after induction, the oxidative stress parameters remained increased. There was breakage of BBB at all times and treatment for both vitamins prevented this dysfunction. In animals submitted to meningitis treatment with vitamin B6 and B9 prevented cognitive impairment and increase BDNF the levels in the hippocampus. These results show that adjuvant treatment with vitamin B6 and B9 was able to prevent oxidative stress, BBB rupture and increase the BDNF levels and to some extent prevented cognitive impairment in Wistar rats submitted to *S. pneumoniae* meningitis.

Key words: Meningitis, vitamin B6, vitamin B9, cognition, oxidative stress, BDNF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fisiopatologia do <i>S. pneumoniae</i> no SNC: reconhecimento, invasão e resposta do hospedeiro..	42
Figura 2: Migração de leucócitos.....	43
Figura 3: Ilustração do SNC e BHE.....	47
Figura 4: Representação da linha do tempo para a indução da meningite, tratamento adjuvante com vitamina B6 e morte dos animais em 24 horas para parâmetros de estresse oxidativo.....	59
Figura 5: Representação da linha do tempo para a indução da meningite, tratamento adjuvante com vitamina B9 e morte dos animais em 24 horas para parâmetros de estresse oxidativo.....	59
Figura 6: Representação da linha do tempo para a indução da meningite, tratamento adjuvante e morte dos animais para avaliação da integridade da BHE.	60
Figura 7: Representação da linha do tempo para a indução da meningite, tratamento adjuvante com vitamina B6, testes comportamentais e morte dos animais para parâmetros de estresse oxidativo e níveis de BDNF.	60
Figura 8: Representação da linha do tempo para a indução da meningite, tratamento adjuvante com vitamina B9, testes comportamentais e morte dos animais para parâmetros de estresse oxidativo e níveis de BDNF.	61
Figura 9: Teste de habituação ao campo aberto..	64
Figura 10: Teste de esquiva inibitória.....	65
Figura 11: Teste de reconhecimento de objetos.....	66
Figura 12: Avaliação dos níveis de MDA, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no hipocampo de ratos Wistar adultos 24 horas após a indução de meningite pneumocócica com tratamento adjuvante com vitamina B6.....	69
Figura 13: Avaliação dos níveis de MDA, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 24 horas após a indução de meningite pneumocócica com tratamento adjuvante com vitamina B6.	71
Figura 14: Avaliação dos níveis de MDA, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no hipocampo de ratos Wistar adultos 24 horas após a indução de meningite pneumocócica com tratamento adjuvante com vitamina B9.....	73

Figura 15: Avaliação dos níveis de MDA, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 24 horas após a indução de meningite pneumocócica com tratamento adjuvante com vitamina B9.	74
Figura 16: Integridade da BHE em animais submetidos à meningite por <i>S. pneumoniae</i> e tratados com vitamina B6 ou B9 (10 e 50 mg/kg)... ..	75
Figura 17: Teste de habituação ao campo aberto 10 dias após a indução da meningite por <i>S. pneumoniae</i>	77
Figura 18: Teste de esquia inibitória 10 dias após a indução da meningite por <i>S. pneumoniae</i>	78
Figura 19: Teste de reconhecimento de objetos 10 dias após a indução da meningite pneumocócica.	79
Figura 20: Teste comportamental de habituação ao campo aberto 10 dias após indução de meningite pneumocócica.....	80
Figura 21: Teste de esquia inibitória 10 dias após a indução da meningite por <i>S. pneumoniae</i>	81
Figura 22: Teste de reconhecimento de objeto 10 dias após a indução da meningite por <i>S. pneumoniae</i>	82
Figura 23: Avaliação dos níveis de MDA, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no hipocampo de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução de meningite pneumocócica com tratamento adjuvante com vitamina B6.....	83
Figura 24: Avaliação dos níveis de MDA, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução de meningite pneumocócica com tratamento adjuvante com vitamina B6.....	85
Figura 25: Avaliação dos níveis de MDA, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no hipocampo de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução de meningite pneumocócica com tratamento adjuvante com vitamina B9.....	87
Figura 26: Avaliação dos níveis de MDA, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução de meningite pneumocócica com tratamento adjuvante com vitamina B9.....	89

Figura 27: Níveis de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal de animais tratados com vitamina B6 10 dias após a indução de meningite pneumocócica.....	90
Figura 28: Níveis de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal de animais tratados com vitamina B9 10 dias após a indução de meningite pneumocócica.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise da Variância (do inglês, *Analysis of Variance*);
APAF-1: Fator Ativador de Apoptose 1 (do inglês, *Apoptosis-Activating Factor 1*);
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutada;
BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*);
BHE: Barreira Hematoencefálica;
CAT: Catalase;
CbpA: Proteína A de Ligação à Colina (do inglês, *Pneumococcal Choline-Binding Protein A*);
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais;
CXCL-8: Quimiocina (C-X-C) Ligada 8 (do inglês, *Chemokine (C-X-C) Ligand 8*);
DNA: Ácido Desoxirribonucleico (do inglês: *Deoxyribonucleic Acid*);
ERO: Espécies Reativas ao Oxigênio;
GlpO: α -glicerofosfato oxidase;
GPx: Glutathione Peroxidase;
H. influenza: *Haemophilus influenza*;
H₂O: Água;
H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio;
H₃PO₄: Ácido Fosfórico;
ICAM-1: Molécula de Adesão Intercelular-1 (do inglês, *Intercellular Adhesion Molecule-1*);
ICAM-2: Molécula de Adesão Intercelular-2 (do inglês, *Intercellular Adhesion Molecule-2*);
IDO: Indoleamina 2,3 Dioxigenase (do inglês, *Indoleamine 2,3 Dioxygenase*);
IL: Interleucina;
IRAK-4: Receptor de Interleucina Associado à Quinase 4 (do inglês, *Interleukin Receptor Associated kinase 4*);
Kg: Quilograma;
LCR: Líquido Cefalorraquidiano;
MDA: Malondialdeído;
MyD88: Proteína de diferenciação mielóide 88 (do inglês, *Myeloid differentiation factor 88*)

MMP: Metaloproteinase de Matrix (do inglês, *Matrix Metalloproteinase*);
MPO: Mieloperoxidase (do inglês, *Myeloperoxidase*);
N. meningitidis: *Neisseria meningitidis*;
Nan-A: neuraminidase A;
NF-Kb: Fator Nuclear kappa B (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*);
NMDA: N-Metil-D- Aspartato (do inglês, *N-Methyl-D-Aspartate*);
NO: Óxido Nítrico (do inglês, *Nitric Oxide*);
NOD: Domínio de Oligomerização de Ligação de Nucleotídeos (do inglês, *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain*);
O₂⁻: Ânion Superóxido;
ONOO⁻: Peroxinitrito;
P53: Proteína Percussora de Tumor;
PAF: Fator de Ativação de Plaquetas (do inglês, *Platelet Activating Factor*);
PAFr: Receptor de Fator Ativador de Plaquetas Humano (do inglês, *Platelet-Activating Factor Receptor*);
PAMP: Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*);
PECAM: Molécula de Adesão 1 de Células Endoteliais Plaquetárias (do inglês, *Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*);
plgR: Receptor Polimérico de Imunoglobulina (do inglês, *Immunoglobulin Polymer Receptor*);
PLP: Piridoxol 5'-Fosfato;
Ply: Pneumolisina ;
PMP: Piridoxamina 5'-Fosfato;
PNP: Piridoxina5'-Fosfato;
PRR: Receptores de Reconhecimento Padrão (do inglês, *Pattern recognition receptors*);
RNA: Ácido Ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*);
S. pneumoniae: *Streptococcus pneumoniae*;
SINAN: Sistema de Informação de Agravado de Notificações;
SNC: Sistema Nervoso Central;
SOD: Superóxido Dismutase;
SPSS: Pacote Estatístico para Ciências Sociais (do inglês, *Statistical Package for Social Sciences*);
TIR: Receptor de Domínio Homólogo ao Toll de Interleucina (do inglês, *Toll Interleukine Receptor*);

TLR: Receptor *Toll like* (do inglês, *Toll like Receptor*);
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês, *Tumor Necrosis Factor Alpha*);
TRAF: Fator Associado ao Receptor do TNF (do inglês, *TNF Receptor Associated Factor*);
TRAK: Fator Associado ao Fator de Necrose Tumoral Quinase (do inglês, *Tumour Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Kinase*);
UFCol: Unidade Formadora de Colônias;
UNESC: Universidade do Extremo Sul Catarinense;
 μg : Micrograma;
 μL : Microlitro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	37
1.1	EPIDEMIOLOGIA	38
1.2	FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE PNEUMOCÓCICA	40
1.3	ESTRESSE OXIDATIVO DURANTE A MENINGITE PNEUMOCÓCICA	43
1.4	BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	46
1.5	FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)	48
1.6	VITAMINA B6	49
1.7	VITAMINA B9	52
1.8	JUSTIFICATIVA	54
2	OBJETIVOS.....	55
2.1	OBJETIVO GERAL	55
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA	56
3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	56
3.3	CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	56
3.4	ORGANISMO INFECTANTE	56
3.5	MODELO ANIMAL DE MENINGITE	57
3.6	GRUPOS EXPERIMENTAIS	57
3.7	TRATAMENTO	58
3.8	DESENHO EXPERIMENTAL	58
3.9	TESTES BIOQUÍMICOS	61
3.9.1	Avaliação de danos oxidativos e defesa enzimática	61
3.10	TESTES COMPORTAMENTAIS	63
3.10.1	Habituação ao campo aberto.....	63
3.10.2	Esquiva inibitória	64
3.10.3	Memória de reconhecimento de objetos	65
3.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	67
4	RESULTADOS	68
4.1	PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO 24 HORAS APÓS A INDUÇÃO EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B6.....	68

4.2 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO 24 HORAS APÓS A INDUÇÃO EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B9.....	72
4.3 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BHE.....	75
4.4 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B6.....	76
4.5 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B9.....	79
4.6 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B6	82
4.7 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B9	86
4.8 NÍVEIS DE BDNF 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B6.....	90
4.9 NÍVEIS DE BDNF 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B9.....	91
5 DISCUSSÃO.....	93
6 CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS	101
ANEXOS	120

1 INTRODUÇÃO

O termo meningite refere-se ao processo inflamatório das meninges que pode ser ocasionado por diversos agentes infecciosos, tais como bactérias, vírus e fungos, e agentes não infecciosos, como traumatismos (Brasil, 2009).

A meningite pneumocócica é umas das mais complexas e graves infecções do sistema nervoso central (SNC) associada com graves distúrbios neurológicos e neuropsicológicos (Merkelbach et al., 2000; Abrahao et al., 2005; Hoogman et al., 2007). As meninges mais afetadas são a pia-máter e a aracnóide podendo resultar em danos nas estruturas corticais e subcorticais do cérebro (Meli et al., 2002). Clinicamente se manifesta com dor de cabeça e rigidez de nuca e é diagnosticada em pacientes por exame no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Richie e Josephson, 2015).

Apesar da implementação de vários programas de vacinação e agentes antimicrobianos a meningite pneumocócica continua sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Shin e Kim, 2012). Mesmo com a eficácia das terapias antimicrobianas e cuidados intensivos, aproximadamente 50% dos sobreviventes sofrem de sequelas em longo prazo, incluindo a perda de audição, déficits sensorio-motores e dificuldades de aprendizagem e memória (Van De Beek et al., 2002; Mook-Kanamori et al., 2011).

A bactéria Gram-positiva *Streptococcus pneumoniae* é um importante residente comensal da nasofaringe humana. Embora a colonização seja geralmente assintomática, o *S. pneumoniae* pode se tornar invasivo e se espalhar do trato respiratório superior para outros órgãos, levando a doenças graves como pneumonia, sepse ou meningite (Henriques-Normark e Tuomanen, 2013). O *S. pneumoniae* é a principal causa etiológica de meningite bacteriana, responsável por dois terços dos casos de meningite na Europa e nos EUA (Brouwer et al., 2010). Para que ocorra a colonização da nasofaringe e posterior invasão e disseminação das vias respiratórias inferiores são necessárias a expressão e a interação particular dos fatores de virulência com as células receptoras do hospedeiro (Zhang et al., 2000; Kadioglu et al., 2008). Uma rota principal para que as bactérias alcancem as meninges é através da corrente sanguínea (Mook-Kanamori et al., 2011). Tendo alcançado os vasos sanguíneos no cérebro, as bactérias atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) para adentrar o SNC e causar infecção. Isso é apoiado por recentes análises de imunofluorescência combinadas

com microscopia confocal de alta resolução, onde foi claramente demonstrado que *S. pneumoniae* adere ao endotélio vascular cerebral antes da invasão do cérebro (Iovino et al., 2013). Já no SNC, ocorre a replicação de bactérias no espaço subaracnóide simultaneamente com a liberação dos seus compostos, como ácido lipoteicoico, peptidoglicano, DNA e fragmentos da parede celular (Sellner et al., 2010a; Mook-Kanamori et al., 2011).

A liberação desses componentes induz a resposta imune inata (Sellner et al., 2010b; Mook-Kanamori et al., 2011) pela ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), e, posteriormente, a produção de mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), interleucina (IL) 1 beta (IL-1 β) e IL-6, iniciando uma cascata de mediadores inflamatórios, incluindo outras interleucinas, quimiocinas, prostaglandinas, metaloproteinases de matriz (MMP), óxido nítrico (NO) e espécies reativas ao oxigênio (ERO). Estas alterações inflamatórias contribuem significativamente para a lesão do SNC comumente associada com meningite bacteriana (Hirst et al., 2004).

A falta de uniformidade nos danos ocasionados gera uma dificuldade para avaliar a severidade e o grau dos prejuízos neuronais, dificultando a quantificação dos danos cerebrais, especialmente em períodos imediatamente após a lesão, criando obstáculos para novas terapias eficazes no tratamento da meningite bacteriana (Sellner et al., 2010a).

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Estimativas globais apontam aproximadamente 1,2 milhões de casos de meningite e cerca de 171.000 mortes no mundo a cada ano (Ceyhan et al., 2008). Embora haja o aumento da disponibilidade antimicrobiana e de cuidados intensivos a meningite bacteriana continua como uma significativa causa de morbidade e mortalidade, apresentando mundialmente uma taxa de mortalidade entre 20 a 30% (Brouwer et al., 2010). Além disso, sequelas neurológicas são relativamente comuns nos sobreviventes de meningite bacteriana, fazendo com que aproximadamente 50% dos pacientes sofram com déficit sensorio motor, convulsões, prejuízos no aprendizado e na memória, déficit de atenção, lentidão de resposta auditiva e cegueira (Van De Beek et al., 2004), sendo evidenciada associação, inclusive, com doenças psiquiátricas como psicose e esquizofrenia (Abraham et al., 2005).

A incidência estimada de meningite bacteriana é de 0,8 - 2,6 por 100.000 adultos por ano nos países desenvolvidos e pode ser até 10 vezes maior nos países em desenvolvimento (Van De Beek, 2012; Engelen-Lee et al., 2016). Essa incidência depende, ainda, de outros fatores, tais como a faixa etária, a cobertura vacinal e outras condições predisponentes, por exemplo, imunodeficiências específicas (Mcintyre et al., 2012). No Reino Unido e na Europa Ocidental, a incidência é de 1 a 2 casos por 100.000 pessoas por ano, enquanto que pode atingir 1.000 casos por 100.000 pessoas por ano na região de Sahel, na África. A redução da incidência ocorreu nas últimas décadas, em grande parte secundária à introdução e uso de vacinas conjugadas (Martin et al., 2014; Okike et al., 2014). As vacinas conjugadas têm uma proteína ligada ao polissacarídeo capsular bacteriano. Isto provoca uma resposta imunológica mais robusta e sustentada, especialmente em crianças. As maiores reduções na mortalidade associada à meningite, globalmente, ocorreram em crianças menores de 5 anos de idade, com uma diminuição de 43% em neonatos e de 54% nas crianças com idades entre 1 a 59 meses. Para os maiores de 5 anos, o número de mortes globalmente diminuiu apenas 2.7%, passou de 165.900 para 161.500 entre 1990 e 2013 (GBD, 2015).

Os patógenos predominantes causadores de meningite após o período neonatal são *S. pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*, responsáveis por 70 a 80% e 10 a 20% dos casos de meningite bacteriana na Europa e nos Estados Unidos, respectivamente (Brouwer et al., 2010). As taxas de letalidade relatadas variam de acordo com a idade do paciente, patógeno causador e *status* de renda do país. A meningite causada por *S. pneumoniae* apresenta as maiores taxas de letalidade, variando de 20 a 37% nos países de alta renda e até 51% nos países de baixa renda. As taxas de letalidade para a meningite meningocócica são mais baixas, variando entre 3 a 10% para os países de alta e baixa renda (Sridhar et al., 2015; Lucas et al., 2016). Os principais agentes etiológicos da meningite bacteriana no Brasil são *N. meningitidis* (28%), *S. pneumoniae* (16%) e *Haemophilus influenzae* tipo b (2%), outras bactérias (23%) e bactéria não especificada (31%) (SVS, 2014).

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no Brasil, em 2014, foram confirmados 17.434 casos de meningites. Do total de casos, 34% (n = 5.848) foram registrados como etiologia bacteriana, e destas 16% dos casos foram confirmadas como sendo meningite pneumocócica (n = 947) (SVS, 2014).

Nos Estados Unidos, dados revelaram uma incidência anual de meningite bacteriana de 3 a 6 casos, na França de 2,23 casos todos por 100.000 habitantes (Honda e Warren, 2009; Varon, 2009). Os custos associados às sequelas pós-meningite têm um impacto econômico importante nos sistemas de saúde (Portnoy et al., 2015). 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).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE PNEUMOCÓCICA

Muitos aspectos da patogênese da meningite bacteriana ainda precisam ser compreendidos. Entretanto, há quatro processos principais: colonização, invasão na corrente sanguínea, sobrevivência na corrente sanguínea e entrada no espaço subaracnóideo. A inflamação subsequente e os danos neurológicos são causados por uma combinação de fatores bacterianos e hospedeiros. Muitas bactérias que causam meningite inicialmente colonizam as membranas da mucosa do trato respiratório superior (Mcgill et al., 2016). Utilizando seus diversos mecanismos de virulência para burlar as barreiras naturais do hospedeiro, o pneumococo prende-se ao epitélio da nasofaringe através da ligação da fosforilcolina ao fator de ativação de plaquetas (PAF) ou pela ligação da proteína ligadora de colina com o receptor epitelial polimérico de imunoglobulina, posteriormente, a bactéria atravessa o endotélio por mecanismos inter e pericelular (Mook-Kanamori et al., 2011).

A maioria dos casos de meningite ocorre após a bacteremia no contexto de doença sistêmica, mas a alta incidência de meningite pneumocócica em pacientes com sinusite e otite média sugere que a disseminação direta para o SNC também pode ocorrer. Essa possibilidade é suportada por modelos de camundongos que desenvolveram meningite pneumocócica após infecção respiratória sem envolvimento da corrente sanguínea (Marra e Brigham, 2001). A invasão bacteriana do SNC também é possível através de infecções locais, má formação na dura-máter, após neurocirurgia ou trauma crânio-cervical (Sellner et al., 2010a). No SNC, o pneumococo novamente pode utilizar a interação entre a fosforilcolina da sua parede celular com o receptor PAF, atravessando a BHE através do mecanismo transcelular ou causando o rompimento das junções apertadas e atravessando por via intercelular (Sellner et al., 2010a).

Devido a falta de defesas do hospedeiro no espaço subaracnóideo, as bactérias se multiplicam de forma relativamente desimpedida. Simultaneamente a isso, ocorre a lise bacteriana em resposta a antibióticos ou, no caso de pneumococos, quando as bactérias atingem a fase de crescimento estacionária (autólise). A lise leva à liberação de seus componentes, como peptidoglicano, ácido lipoteicóico, DNA e fragmentos da parede celular, que são conhecidos como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Estes PAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores Toll-likes (TLRs), os adaptadores de proteínas intracelulares conhecidas como domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NLR) e as proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos presentes na superfície das células hospedeiras (Savva e Roger, 2013), componentes fundamentais que induzem a resposta imune inata (Sellner et al., 2010b; Mook-Kanamori et al., 2011).

Após o reconhecimento dos PAMPs, inicia-se a sinalização intracelular, através da transmissão de sinal do domínio citoplasmático do TLR, conhecido por receptor de domínio homólogo Toll-IL-1 (TIR), para o receptor de interleucina-1 associado à quinase 4 (IRAK-4), sendo este ativado (Cohen, 2002). A ativação de IRAK-4 é mediada pela proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88). O IRAK-4 estimula o fator associado ao fator de necrose tumoral (TRAF) e, sequencialmente, o fator associado ao fator de necrose tumoral quinase (TRAK) (Annane et al., 2005). Essa cascata de sinalização resulta na liberação do NF- κ B que se desloca para o núcleo da célula. O NF- κ B se liga ao DNA, ativando assim centenas de genes específicos que promovem a expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β e também moléculas anti-inflamatórias como a IL-10 (Zingarelli, 2005) (figura 1), aumentando assim a produção de outras interleucinas, quimiocinas, prostaglandinas, MMP, NO e ERO (Hirst et al., 2004).

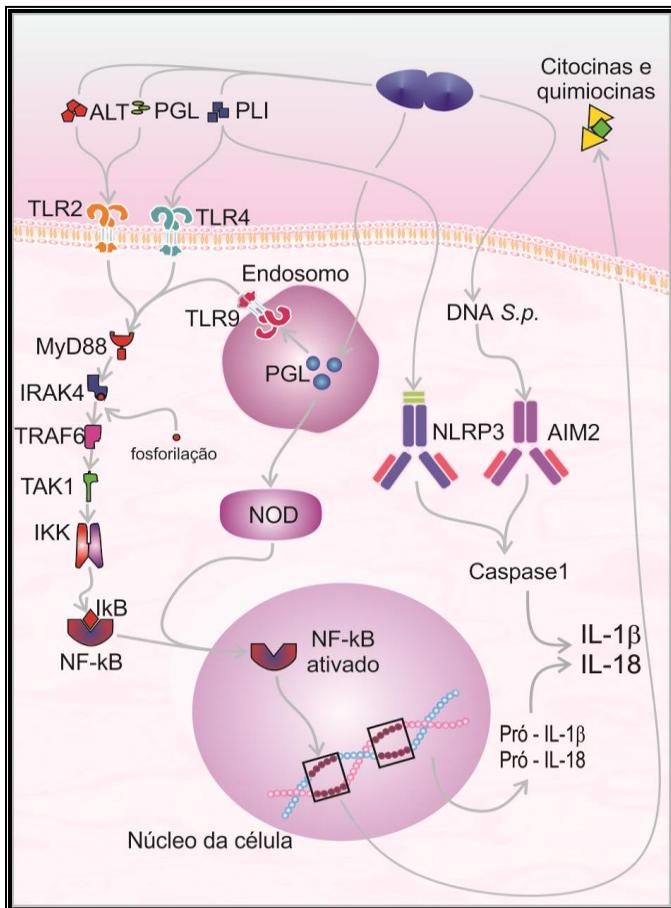


Figura 1: Fisiopatologia do *S. pneumoniae* no SNC: reconhecimento, invasão e resposta do hospedeiro. Adaptado de Barichello et al., 2013a. AIM2, ausente no melanoma; ALT, ácido lipoteicoico; IKB, inibidor de NF-κB; IKK, inibidor de quinase IκB; IL, interleucina; IRAK-4, receptor de interleucina associado à quinase 4; MyD88, proteína de diferenciação mielóide 88; NF-κB, fator nuclear kappa B; NLRP3, domínio de ligação a nucleótidos e proteína de repetição rica em leucina 3; NOD, domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos; PGL, peptidoglicano; PLI, pneumolisina; TAK, fator de crescimento transformador ativado quinase; TLR, receptor Toll-like; TRAF, fator associado ao receptor do TNF; TRAK, fator associado ao fator de necrose tumoral quinase.

Em consequência à produção de citocinas, leucócitos polimorfonucleares são atraídos e ativados e, grandes quantidades de ERO são produzidas (Kastenbauer et al., 2002a). Um sulfatado de glicoproteínas presente na superfície dos leucócitos chamado sialil-Lewis^x liga-se as selectinas P e E das células endoteliais. Esta ligação torna-se mais forte quando CXCL-8 se liga ao seu receptor específico nos neutrófilos. As citocinas pró-inflamatórias, como o 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 ICAM-1 permite a passagem de neutrófilos em direção ao gradiente de substâncias quimioatraentes (Hanna e Etzioni, 2012). Isso leva a formação de estresse oxidativo, produção e liberação de citocinas e quimiocinas, aumento da ativação de neutrófilos, peroxidação lipídica, danos ao DNA, nitração de tirosina, a ativação de metaloproteinases de matriz e produção de prostaglandina (Klein et al., 2006) (figura 2).

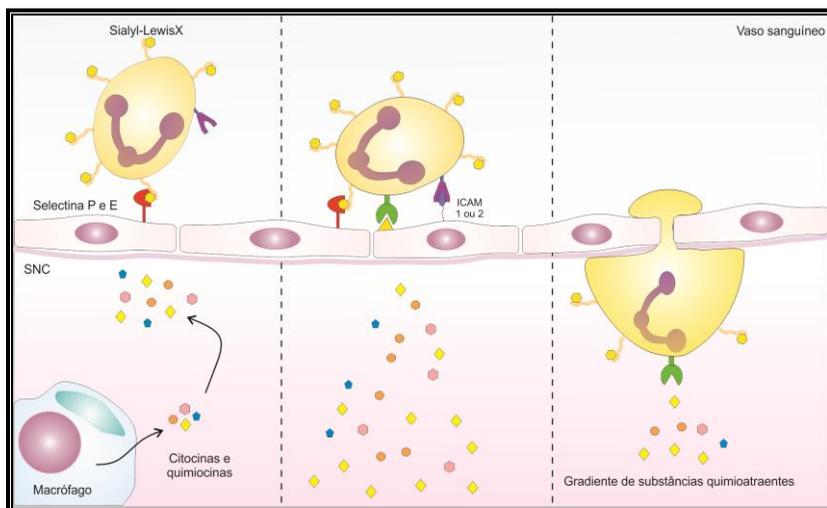


Figura 2: Migração de leucócitos, adaptado de Barichello et al., 2013a. ICAM, molécula de adesão intracelular; SNC, sistema nervoso central.

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO DURANTE A MENINGITE PNEUMOCÓCICA

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), ocasionando um possível dano oxidativo em lipídios, proteínas e o DNA (Dalle-Donne et al., 2003).

O conceito para ERO é de 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 reposta mitogênica (Valko et al., 2007).

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). Diversos tipos celulares podem sofrer dano oxidativo, no entanto, o SNC é particularmente vulnerável aos efeitos deletérios do estresse oxidativo e isso ocorre devido a utilização de altas taxas de oxigênio quando comparado a outros órgãos, 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). Os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo envolvem a atividade de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. No grupo de defesas enzimáticas antioxidantes encontram-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). Enquanto que no grupo de antioxidantes não-enzimáticos estão ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathione, carotenóides, flavonóides e outros (Valko et al., 2007). A SOD, em condições normais, catalisa a reação de conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que é eliminado pela ação das enzimas CAT e GPx (Halliwell, 1987).

A resposta imune do hospedeiro, através da produção de citocinas, quimiocinas e a migração de leucócitos é a primeira linha de defesa em resposta à infecção bacteriana (Scheld et al., 2002). Além disso, os leucócitos polimorfonucleares produzem NO^\bullet , radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). $\text{O}_2^{\bullet-}$ e NO^\bullet podem levar à formação de peroxinitrito (ONOO^\bullet), que é um forte oxidante (Klein et al., 2006). Este oxidante exerce efeitos citotóxicos nas células endoteliais (Szabo, 2003), aumenta a permeabilidade da BHE, induz a peroxidação de lipídios e outras interações complexas que podem estar envolvidas na fisiopatologia da meningite pneumocócica (Klein et al., 2006).

Durante a meningite pneumocócica, espécies reativas de nitrogênio e ERO são produzidas por células imunes residentes do cérebro como

parte da resposta do hospedeiro contra infecções bacterianas (Aycicek et al., 2007; Mook-Kanamori et al., 2011). *S. pneumoniae* também produz H_2O_2 , que interage com NO^\bullet formando $ONOO^\bullet$ (Mitchell, 2000; Braun et al., 2002). O $ONOO^\bullet$ pode danificar neurônios e células gliais por peroxidação lipídica e desestabilização da membrana celular e também pode causar a desintegração do DNA e subsequente ativação de polimerase, o que leva à redução da energia e morte celular (Scheld et al., 2002).

As sequelas neurológicas deixadas pela meningite pneumocócica são estimadas em aproximadamente 50 % dos pacientes sobreviventes (Kastenbauer e Pfister, 2003; Mook-Kanamori et al., 2011). O tratamento adjuvante com antioxidantes preveniu dano cognitivo e o estresse oxidativo no cérebro dos ratos sobreviventes do modelo animal de meningite bacteriana (Barichello et al., 2012d). As ERO estão relacionadas a estas sequelas cognitivas por causa do dano celular que causam. O sistema nervoso é uma rede única de diversos tipos de células, compreendendo múltiplas proteínas, lipídios e carboidratos, e tem importantes interações com todos os principais órgãos do corpo (Harris e Amor, 2011). Dessa maneira, o cérebro torna-se vulnerável aos danos oxidativos devido ao seu alto consumo de oxigênio e baixa expressão de níveis de antioxidantes (Harris e Amor, 2011).

O H_2O_2 e pneumolisina produzida pelo pneumococo pode causar a morte das células neuronais através de dano mitocondrial (Braun et al., 2002; Mitchell et al., 2004), levando à liberação do fator indutor de apoptose (AIF) no citosol e subsequentemente induzindo apoptose por uma via independente de caspase. Além disso, os leucócitos ativam a proteína supressora de tumor (p53) e a cinase de ataxia telangiectasia mutada (ATM), que induzem as mitocôndrias a liberarem o citocromo-c. O citocromo-c e Apaf-1 são necessários para formar o apoptossoma, que é um complexo de proteína especial. Subsequentemente, o apoptossoma ativa a caspase-9, que resulta na ativação da caspase-3 e apoptose (Mitchell et al., 2004; Marek, 2013).

Uma das principais características durante a meningite pneumocócica é a disfunção da BHE. Há registro de quebra da BHE 12 horas após a indução da meningite pneumocócica em modelo animal (Barichello et al., 2012a), e, subsequente, à produção de citocinas (Barichello et al., 2010b). As ERO têm sido implicadas como mediadores da disfunção da BHE (Klein et al., 2006), sugerindo que o aumento da permeabilidade BHE pode estar relacionado com a presença de NO^\bullet e $O_2^{\bullet-}$ (Mayhan, 2000). Além disso, a administração de antioxidante preveniu a quebra

da BHE em meningite pneumocócica experimental (Kastenbauer et al., 1999; Kastenbauer et al., 2002b).

1.4 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

Muitos agentes patogênicos meníngeos são capazes de colonizar a pele e diferentes superfícies mucosas de indivíduos saudáveis. Em certos casos, as bactérias penetram nas barreiras celulares do hospedeiro e iniciam uma infecção local que pode resultar em disseminação sistêmica (Doran et al., 2016). A sobrevivência no sangue é um importante traço de virulência dos agentes patogênicos meníngeos (Rosenstein et al., 2001). Após a sobrevivência na corrente sanguínea ou disseminação de focos infecciosos nas proximidades do cérebro (mastoidite, sinusite), as bactérias podem invadir o SNC, resultando em inflamação das meninges, pleocitose no LCR, infiltração no tecido nervoso e aumento da permeabilidade da BHE (Doran et al., 2016).

A BHE é uma estrutura especializada do SNC que controla e regula a homeostase do cérebro, medula espinhal e LCR com o restante dos sistemas. A barreira é formada pela presença das junções das células endoteliais que formam uma camada que reveste a superfície interior dos vasos sanguíneos e que controlam a abertura e fechamento coordenado das junções célula-célula (Munzel et al., 2008; Stamatovic et al., 2008) (figura 3). Estas junções são compostas de diferentes complexos multi-proteicos, como as junções apertadas e as junções endoteliais aderentes que são os principais reguladores da permeabilidade celular (Bazzoni e Dejana, 2004). Os agentes patogênicos só conseguem invadir o cérebro após atravessar a camada de células endoteliais da BHE e, para isso, devem apresentar estratégias para ultrapassar esta barreira (Doran et al., 2016).

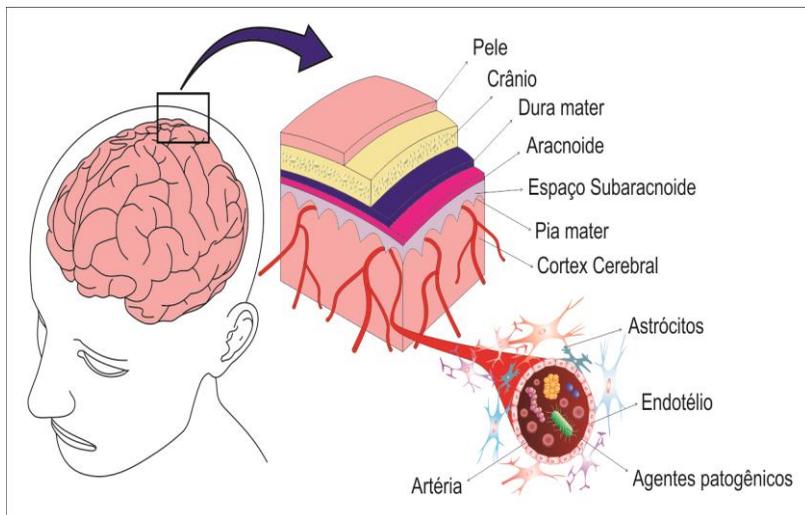


Figura 3: Ilustração do SNC e BHE. Figura elaborada pelo autor, 2017.

Para causar infecção do SNC, o pneumococo necessita colonizar o trato respiratório, burlar as defesas das mucosas e alcançar a corrente sanguínea. Para entrar na corrente sanguínea, um arsenal de fatores de virulência é usado incluindo proteínas de superfície, cápsula de polissacarídeo e parede celular (Doran et al., 2016). Esse mecanismo de entrada, chamado de "invasão inata", neutraliza mecanismos imunes inatos e emprega mimetismo molecular para promover a invasão. A invasão inata é iniciada pela ligação das bactérias ao epitélio respiratório. A adesina, proteína A de ligação à colina (CbpA), liga-se ao receptor polimérico de imunoglobina (pIgR) iniciando, assim, a translocação bacteriana através do epitélio nasofaríngeo (Zhang et al., 2000).

A bacteremia de alto título promove o desenvolvimento de meningite por interações bacterianas com hospedeiro na BHE. No endotélio cerebrovascular, CbpA liga-se ao receptor de laminina (Orihuela et al.). Além do receptor de laminina, demonstrou-se que a molécula de adesão 1 de células endoteliais plaquetárias (PECAM-1, também conhecida como CD31) e o domínio semelhante à lectina da neuraminidase A (NanA) pneumocócica contribuem para a ligação do pneumococo às células endoteliais da BHE (Uchiyama et al., 2009; Iovino et al., 2014).

Após a ligação bacteriana às células epiteliais ou endoteliais, a translocação através da barreira é novamente mediada pelo processo de invasão inata. A fosforilcolina é exibida na superfície de praticamente

todos os patógenos respiratórios e, imitando a quimiocina PAF, medeia a ligação ao receptor de fator ativador de plaquetas humano (PAFr) (Cundell et al., 1995). A ligação de fosforilcolina ao PAFr conduz à captação mediada por clatrina de bactérias num vacúolo, facilitando assim a translocação bacteriana intracelular da corrente sanguínea para o cérebro (Radin et al., 2005). Experimentos usando antagonistas de PAFr ou ratos *knockout* para o PAFr revelaram que as bactérias não invadem a corrente sanguínea ou o SNC quando este receptor não está disponível (Fillon et al., 2006). Além da interação e travessia da BHE mediada pelo receptor nas células hospedeiras, o pneumococo pode ganhar acesso ao SNC paracelularmente por disfunção da integridade da BHE. Este processo é mediado pela citolisina pneumolisina dependente do colesterol (Zysk et al., 2001) e α -glicerofosfato oxidase GlpO (Mahdi et al.) que libera H_2O_2 causando apoptose das células endoteliais microvasculares cerebrais (Kostyukova et al., 1995).

A lesão subsequente do tecido do SNC resulta do dano neuronal apoptótico, isquemia cerebral, edema, hidrocefalia e aumento da pressão intracraniana e pode ser causada por produtos bacterianos tóxicos e vias inflamatórias do hospedeiro iniciadas para eliminar o patógeno (Mook-Kanamori et al., 2011). Em particular, a resposta inflamatória excessiva dos neutrófilos tem sido associada ao aumento da lesão do SNC (Koedel et al., 2009).

1.5 FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)

As neurotrofinas, uma família de fatores neurotróficos, controlam a morte, manutenção e função das células neuronais no desenvolvimento e desempenham um papel importante na diferenciação e sobrevivência neuronal (Gianinazzi et al., 2003). Acredita-se que o efeito destes fatores de crescimento tenha origem na estimulação da neogênese, angiogênese, células estaminais e proteção contra efeitos neutralizantes do estresse neuronal de aminoácidos excitatórios (Solaroglu et al., 2006; Brandt, 2010).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é de particular interesse, uma vez que o seu receptor é encontrado numa ampla variedade de células neuronais e é altamente expresso no hipocampo, exercendo efeitos sobre as funções neuronais na idade adulta e na sobrevivência de várias células do SNC (Nagahara e Tuszynski, 2011). Devido aos seus efeitos neuroprotetores, o BDNF é promissor como tratamento para doenças do SNC (Comim et al., 2013).

A principal função do BDNF é melhorar a transmissão, facilitar a plasticidade e promover o crescimento sináptico tendo, assim, papel fundamental nas funções cognitivas, como aprendizado e memória (Frey et al., 2006). O BDNF promove também formação de sinapses (Park et al., 2013), regulamentando a ramificação axonal e crescimento dendrítico (Cohen-Cory e Fraser, 1995).

O BDNF evita a morte neuronal induzida por diversos tipos de insultos incluindo, isquemia devido à falta de oxigênio, glicose ou privação de soro (Tong e Perez-Polo, 1998), estresse oxidativo (Ferenz et al., 2012; Lee et al., 2012) excitotoxicidade e proteínas tóxicas como a β -amilóide (Arancibia et al., 2008). As funções de pró-sobrevivência do BDNF se manifestam principalmente quando os neurônios estão sobre estresse. Dessa forma, o BDNF pode servir como um regulador da homeostase, provocando funções neuroprotetoras apenas quando os neurônios são atacados em condições patológicas. Além disso, tem sido demonstrado que o BDNF possui efeito redutor de dano neuronal na meningite bacteriana e na isquemia cerebral através do bloqueio da ativação da caspase-3, a qual é associada com a apoptose neuronal, presente em córtex e hipocampo de ratos induzidos a meningite e isquemia (Han e Holtzman, 2000; Bifrare et al., 2005).

Morichi et al. mostraram alterações dos níveis de BDNF no soro e LCR de pacientes pediátricos com meningite bacteriana (Morichi et al., 2013). Já é bem descrito na literatura que o BDNF desempenha um papel crucial na aprendizagem e na memória (Rattiner et al., 2005; Bekinschtein et al., 2007), o que sugere que a hipótese de que a disfunção cognitiva após meningite bacteriana pode ser correlacionada às alterações desta neurotrofina.

1.6 VITAMINA B6

A vitamina B6 é um nome genérico que inclui três derivados de piridina modificados na sua posição 4 e chamados de piridoxal, piridoxamina e piridoxina, portando um grupo aldeído, aminometil e hidroximetil, respectivamente. Todas as três formas existem como derivados que são fosforilados na posição 5. Estes são piridoxal 5'-fosfato (PLP), piridoxamina 5'-fosfato (PMP) e piridoxina 5'-fosfato (PNP) (Coburn, 1996). A PLP não é sintetizada em humanos, mas é obtida a partir de vários alimentos, incluindo carne, produtos lácteos, feijões, nozes, batatas e várias frutas e legumes. Os produtos de origem

animal contêm principalmente PLP e PMP, enquanto que em produtos derivados de plantas, PNP é principal forma de B6 (Coburn, 2015).

A PLP, o vitâmero ativo de B6, serve como co-fator para mais de 150 enzimas, que constituem cerca de 4% de todas as atividades enzimáticas (Percudani e Peracchi, 2009). Estas enzimas catalisam uma vasta gama de reações envolvendo aminoácidos e aminas, incluindo transaminações, clivagens de aldol e α -descarboxilações (Eliot e Kirsch, 2004). A maior parte das reações faz parte da síntese e degradação de aminoácidos, enquanto outras estão relacionadas ao metabolismo de um carbono, metabolismo lipídico, gliconeogênese e biossíntese de neurotransmissores (Eliot e Kirsch, 2004; Percudani e Peracchi, 2009). Além de funcionar como um co-fator, a vitamina B6 foi descrita como um eliminador de ERO (Kannan e Jain, 2004), quelante de ferro (Wondrak e Jacobson, 2012) e chaperona no processo de dobramento enzimático (Cellini et al., 2014).

A deficiência dietética de vitamina B6 é rara nos países desenvolvidos, mas a baixa concentração de vitamina B6 circulante tem sido relatada em usuários de contraceptivos orais (Spinneker et al., 2007), fumantes (Midttun et al., 2011), indivíduos com alcoolismo (Ulvik et al., 2010), doença celíaca e diabetes. A baixa ingestão de vitamina B6 está associada a um aumento do risco de doença cardiovascular (Tavani et al., 2004) e câncer (Zhang et al., 2013).

A vitamina B6 está relacionada com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias quando presente em baixas concentrações no plasma (Friso et al., 2001). A PLP apresentou uma associação inversa com marcadores inflamatórios em estudos clínicos e populacionais (Friso et al., 2004; Ulvik et al., 2012). Estudos de coortes populacionais demonstraram que a PLP plasmática está inversamente relacionada com numerosos marcadores de inflamação, incluindo proteína C reativa (Shen et al., 2010), receptor de IL-6 (Gori et al., 2006), contagem de leucócitos e proporção quinurenina/triptofano (Theofylaktopoulou et al., 2014). Estes resultados sugerem que a vitamina B6 protege contra a inflamação e que a inflamação afeta negativamente o estado da vitamina B6 tal como medido pela PLP no plasma (Morris et al., 2010).

Pesquisas demonstram que a inflamação conduz a uma redução acentuada de PLP plasmática. As alterações na distribuição de vitamina B6 no tecido durante a inflamação podem modular enzimas dependentes de PLP e vias metabólicas que desempenham um papel significativo na resposta inflamatória. As redes dependentes de vitamina B6 de metabólitos com efeitos imunomoduladores e/ou que respondem a

inflamação podem ser designadas como vias inflamatórias dependentes de vitamina B6 (Ueland et al., 2016).

A fisiopatologia da meningite pneumocócica é iniciada pela ativação do sistema imunológico do hospedeiro, levando à indução de vias metabólicas no cérebro (Bellac et al., 2006a). A reação inflamatória, pela liberação de mediadores inflamatórios como as citocinas, ativa via da quinurenina através da ativação da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) (Macchiarulo et al., 2009), que é amplamente manifestada nos tecidos, macrófagos e células dendríticas (Shimizu et al., 1978). Isso contribui para apoptose do hipocampo, uma forma de lesão cerebral associada a déficits de aprendizagem e memória (Liechti et al., 2014).

O aminoácido essencial triptofano é principalmente catabolizado ao longo da conhecida via da quinurenina, que produz uma variedade de compostos, muitos dos quais com efeitos imunomoduladores. Várias enzimas envolvidas na via da quinurenina requerem PLP como co-fator e sua expressão é regulada por citocinas inflamatórias (Pinto et al., 2014). A quinurenina é metabolizada em ácido quinurênico ou ácido antranílico através de reações catalisadas pela quinurenina aminotransferase ou quinureninase, ambas enzimas necessitam de PLP atuando como co-factor (Phillips, 2014).

A IDO na microglia cataboliza o aminoácido L-triptofano à quinurenina (Munn et al., 1999; Guillemin et al., 2005). O aumento da degradação do triptofano causada pela ativação da via da quinurenina pode também estar envolvido nos processos que resultam em danos neuronais observados na meningite pneumocócica (Bellac et al., 2006a; 2010; De Souza et al., 2011). O efeito neurotóxico dos intermediários 3-hidroxiquinurenina e ácido 3-hidroxi-antranílico envolve a geração de superóxido e H_2O_2 que contribuem para processos oxidativos implicados na fisiopatologia da meningite. Em contrapartida, o ácido quinurênico, um produto final da via da quinurenina, é um metabólito neuroprotetor e imunomodulador que inibe o receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) e protege contra danos cerebrais excitotóxicos em meningite bacteriana experimental (Bellac et al., 2006a).

A quinurenina, por sua vez, é metabolizada numa sucessão de compostos com propriedades neurotóxicas. Um dos seus metabólitos, o ácido quinolínico, pode aumentar a liberação do glutamato e inibir sua receptação por astrócitos, aumentando, deste modo, sua concentração no microambiente, causando neurotoxicidade, gerando o estresse oxidativo, disfunção energética, rompimento do citoesqueleto, morte celular e

alterações comportamentais (Lugo-Huitron et al., 2013). Assim, a vitamina B6, desempenha um papel na prevenção de acúmulo de intermediários neurotóxicos produzidos durante o metabolismo do triptofano (Van De Kamp e Smolen, 1995). Zysset et al. (2013) demonstrou que a vitamina B6 levou a uma redução significativa da apoptose do hipocampo pela regulação negativa dos genes envolvidos em processos de resposta inflamatória, sinalização neuronal e morte celular apoptóticas. A vitamina B6, também tem sido implicada no aumento da expressão do BDNF no hipocampo de ratos em meningite experimental (Zysset-Burri et al., 2013). Além disso, esta neurotrofina é envolvida na neurogênese e protege contra várias formas de lesão cerebral em meningite pneumocócica (Bifrare et al., 2005), bloqueia a ativação da caspase-3 (Han et al., 2000), e reduz a apoptose em modelos animais de meningite (Li et al., 2007).

1.7 VITAMINA B9

O ácido fólico (vitamina B9) é um co-fator no metabolismo de um carbono que promove a restauração da metionina a partir da homocisteína (Kronenberg et al., 2009). Essa vitamina é um nutriente essencial da dieta humana envolvida em numerosas reações metabólicas, por exemplo, a biossíntese de DNA e RNA e interconversões de aminoácidos (Zhao et al., 2016). A estimulação do sistema imune pode contribuir para a hiperhomocisteinemia em algumas doenças inflamatórias como sepse e meningite (Ploder et al., 2010). A vitamina B9 exerce ações neuroprotetoras prevenindo os danos causados por hiper-homocisteinemia aguda *in vivo* (Tagliari et al., 2006).

A suplementação com vitamina B9 leva a uma diminuição nos níveis de homocisteína e previne as alterações patogênicas e epigenéticas, exibindo eficácia protetora contra a neurotoxicidade induzida por homocisteína (Kalani et al., 2014). A homocisteína atua como um agonista direto no local de ligação do glutamato no receptor NMDA (Lipton et al., 1997). Além disso, o tratamento com vitamina B9 impede déficits de memória e redução de níveis do BDNF induzidas por injeção de homocisteína (Matte et al., 2009). A alteração de micronutrientes maternos, tais como vitamina B9, vitamina B12 e ômega-3, reduz os níveis de BDNF em gestações pré-termo (Dhobale e Joshi, 2012). Uma forma potencial de prevenção de danos na meningite pneumocócica está relacionada com a capacidade da vitamina B de se ligar a uma proteína apresentadora de antígeno que estimula as células imunes

especializadas, o que foi sugerido como um novo mecanismo pelo qual o sistema imunológico detecta infecções microbianas (Kjer-Nielsen et al., 2012).

A vitamina B9 tem um papel importante na neuroplasticidade e preservação da integridade neuronal (Kronenberg et al., 2009). A suplementação com vitamina B9 aumenta reparos do SNC em adultos (Iskandar et al., 2004) e também promove a neurogênese hipocampal preservando as funções cognitivas após o acidente vascular cerebral no cérebro adulto (Zhang et al., 2012). A importância da vitamina B9 no sistema nervoso foi inicialmente descrita em estudos que encontraram um risco aumentado de transtornos no neuro-desenvolvimento na prole de mulheres grávidas com deficiência desse nutriente (Smithells et al., 1976; Blom et al., 2006). Desde então, foram obtidas sólidas evidências epidemiológicas que relacionam o metabolismo anormal da vitamina B9 com defeitos do tubo neural (Blom et al., 2006). Além disso, a fortificação compulsória de vitamina B9 nos EUA levou a um declínio significativo na prevalência de espinha bífida e anencefalia (Williams et al., 2002; Williams et al., 2005). Em mamíferos adultos, incluindo o humano, novos neurônios continuam a ser gerados no giro dentado do hipocampo (Eriksson et al., 1998) e a deficiência experimental de vitamina B9 *in vivo* diminui o número de células em proliferação no giro dentado do hipocampo em ratos adultos (Kruman et al., 2005). Demonstrou-se que a deficiência de vitamina B9 ou o antagonismo de folato exercem efeitos profundos sobre oligodendrócitos, astroglia e microglia. Usando ressonância magnética, foi observado que baixas concentrações de vitamina B9 em seres humanos possuem associação com a redução do volume hipocampal e amígdala e atrofia cerebral global (Yang et al., 2007).

Em relação à plasticidade sináptica, foram relatados efeitos diretos da vitamina B9 sobre a neurotransmissão, por exemplo, aumento da neurotransmissão dopaminérgica no núcleo *accumbens* (Stephens e Uretsky, 1986; Kronenberg et al., 2009), aumento da excitabilidade dos circuitos do hipocampo, que envolve um bloqueio pós-sináptico das respostas gabaérgicas. A importância da vitamina B9 no sistema nervoso também foi demonstrada em muitos outros transtornos neurológicos, incluindo defeitos no tubo neural em fetos e doença de Alzheimer em idosos. Estudos anteriores mostraram que níveis baixos de vitamina B9 estão associados com acidente vascular cerebral isquêmico. A suplementação de vitamina B9 como prevenção primária

pode reduzir em 18% o risco de acidente vascular cerebral (Lin et al., 2004).

Além do seu papel essencial na síntese de DNA, RNA e proteínas para a função neurológica (Kronenberg et al., 2009; Fenech, 2010), a vitamina B9 tem sido postulado como um agente antidepressivo, baseado em estudos pré-clínicos (Brocardo Pde et al., 2008; Budni et al., 2012) e clínico (Astorg et al., 2008). Do mesmo modo, foram relatadas propriedades anti-maníaca (Brocardo et al., 2010), melhoras cognitivas (Matté et al., 2009a, Singh et al., 2011) e neuroprotetoras para esta vitamina (Matte et al., 2009; Shen et al., 2010; Budni et al., 2011).

1.8 JUSTIFICATIVA

Atualmente, apesar dos avanços nos cuidados de saúde, as taxas de mortalidade por meningite pneumocócica continuam altas e um número considerável de sobreviventes apresentam sequelas comportamentais, perda de audição, convulsões, déficits neurológicos, prejuízo de aprendizagem e perda de memória. No entanto, os mecanismos biológicos que desencadeiam essas alterações cognitivas nos pacientes após meningite bacteriana não são totalmente elucidados. Por essas razões, estudos combinando parâmetros comportamentais e neuroquímicos utilizando tratamentos adjuvantes, que visam à melhora na compreensão dos mecanismos que levam a estes déficits em longo prazo são, sem dúvidas, de suma importância para a comunidade. Estudos vêm demonstrando que a suplementação com vitamina B6 e B9 pode exercer efeito protetor sobre prejuízo de memória e aprendizagem em modelos experimentais de depressão e doenças inflamatórias devido a sua capacidade de reparo neuronal e seu potencial perfil antioxidante. Deste modo, o tratamento adjuvante com vitaminas do complexo B poderia balancear a resposta imune do hospedeiro auxiliando na prevenção de danos cognitivos ocasionados pela meningite pneumocócica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso de vitamina B6 e B9 como terapias na prevenção de danos neuronais ocasionados pela meningite pneumocócica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o dano oxidativo e defesa antioxidante enzimática no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar tratados ou não com vitamina B6 ou B9 24 horas após a indução de meningite pneumocócica.

- Avaliar a integridade da BHE em 12, 18 e 24 horas após a indução de meningite por *S. pneumoniae* nas estruturas cerebrais, hipocampo e córtex, de ratos Wistar adultos tratados ou não com vitamina B6 ou B9.

- Avaliar parâmetros de memória e aprendizagem, através dos testes de habituação ao campo aberto, esquiva inibitória e reconhecimento de objetos de animais induzidos à meningite pneumocócica tratados ou não com vitamina B6 ou B9 10 dias após a indução.

- Avaliar o efeito das vitamina B6 ou B9 sobre os níveis BDNF nas estruturas cerebrais, hipocampo e córtex pré-frontal, de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução de meningite pneumocócica.

- Avaliar o dano oxidativo e defesa antioxidante enzimática no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar tratados ou não com vitamina B6 ou B9 10 dias após a indução de meningite pneumocócica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Experimental e Laboratório de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais, UNESC (121/2012 e 022/2013, anexo).

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo ratos Wistar machos adultos, com 60 dias de vida, com peso corporal de 250 a 350 g e que não tenham sido utilizados em estudos anteriores, provenientes do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), onde permaneceram alojados em local fresco e arejado em um ciclo 12 horas claro/escuro, a uma temperatura de 23 °C +/- 1°C, com alimento e água sempre disponíveis.

Foram excluídos do estudo os animais que apresentaram qualquer má-formação aparente; peso inferior ou superior aos mencionados anteriormente, animais que eventualmente morreram durante o experimento, antecedendo o tempo de eutanásia dos animais.

3.3 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Com base em estudos prévios em pacientes e estudos em modelos animais, para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias calculou-se um tamanho de amostra de 6 animais por grupo para os testes bioquímicos e 10 animais por grupo para os testes comportamentais, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%. O total de animais utilizados para a realização dessa tese foi de 540 ratos Wistar adultos.

3.4 ORGANISMO INFECTANTE

S. pneumoniae, sorotipo III, proveniente do Instituto Adolfo Lutz, foi cultivado durante a noite em 10 mL de Todd Hewitt, em seguida, diluído em meio fresco e crescido até a fase logarítmica. A cultura foi

centrifugada durante 10 min a 5000 x g e re-suspensa em soro fisiológico estéril até a concentração de 5×10^9 UFCol/ml. O tamanho do inóculo foi confirmado por cultura quantitativa (Grandgirard et al., 2007b; Barichello et al., 2010a).

3.5 MODELO ANIMAL DE MENINGITE

Ratos machos Wistar (60 dias de vida) foram utilizados para os experimentos. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso Animal (CEUA/UNESC), Brasil. Todos os procedimentos cirúrgicos e inoculações bacterianas foram realizados sob anestesia consistindo de administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina (6,6 mg/kg) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg) (Grandgirard et al., 2007b; Barichello et al., 2010c). Os animais receberam uma injeção intracisterna (i.c.) de 10 µL de LCR artificial (grupos controles) ou volume equivalente de suspensão de *S. pneumoniae* (grupos meningite). Ao mesmo tempo da inoculação, os animais receberam reposição de fluidos e regressaram às suas gaiolas (Irazuzta et al., 2008; Barichello et al., 2010c). A meningite foi documentada a partir de uma cultura quantitativa de 5 µL de LCR obtidos por punção da cisterna magna (Barichello et al., 2010c). Dezoito horas após a indução da meningite os animais destinados aos testes comportamentais receberam tratamento com antimicrobiano (100 mg/kg de ceftriaxona) a cada 12 horas durante 7 dias.

3.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para os experimentos com vitamina B9 os animais foram divididos em 6 (seis) grupos: controle/salina; controle/B9 10 mg/Kg; controle/B9 50 mg/Kg; meningite/salina, meningite/B9 10 mg/Kg e meningite/B9 50 mg/Kg. Para as dosagens de estresse oxidativo em 24 horas foram utilizados 6 animais por grupo, totalizando 36 animais. Para avaliação da integridade da BHE foram utilizados 6 animais por grupo, tendo a BHE 3 horários diferentes de morte e considerando que cada horário teve 6 grupos o total foi de 108 animais. Para avaliação de parâmetros comportamentais foram utilizados 10 animais por grupo para cada teste, sendo 3 testes o total de 180 animais.

Para os experimentos com vitamina B6, os animais foram divididos em 4 grupos: controle/salina; controle/B6; meningite/salina e meningite/B6. Para as dosagens de estresse oxidativo em 24 horas foram

utilizados 6 animais por grupo, totalizando 24 animais. Para avaliação da integridade da BHE foram utilizados 6 animais por grupo, tendo a BHE 3 horários diferentes de morte e considerando que cada horário teve 4 grupos o total foi de 72 animais. Para avaliação de parâmetros comportamentais foram utilizados 10 animais por grupo para cada teste, sendo 3 testes o total de 120 animais.

3.7 TRATAMENTO

A vitamina B9 (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) foi dissolvida em água destilada e administrada por via oral por gavagem, nas doses de 10 e 50 mg/Kg iniciando o tratamento 18 horas após a indução da meningite e seguindo por 7 dias, 1 vez ao dia. A solução de vitamina B9 foi preparada antes da administração de um volume de 1 mL/kg (Budni et al., 2013). Para os animais dos testes em 24 horas foi administrada uma dose única em 18 horas após a indução.

Os animais receberam 360 µL de vitamina B6 (600 mg/kg; Sigma-Aldrich, Alemanha) ou salina estéril por via subcutânea (sc) em 0 e 18 horas após a indução da meningite (Zysset-Burri et al., 2013).

3.8 DESENHO EXPERIMENTAL

Para as avaliações dos parâmetros de estresse oxidativo em 24 horas os animais foram divididos nos grupos acima descritos e receberam o tratamento com vitamina B6 em 0 e 18 horas e os animais do protocolo com vitamina B9 receberam o tratamento em 18 horas após indução da meningite pneumocócica (figura 4 e 5, respectivamente).

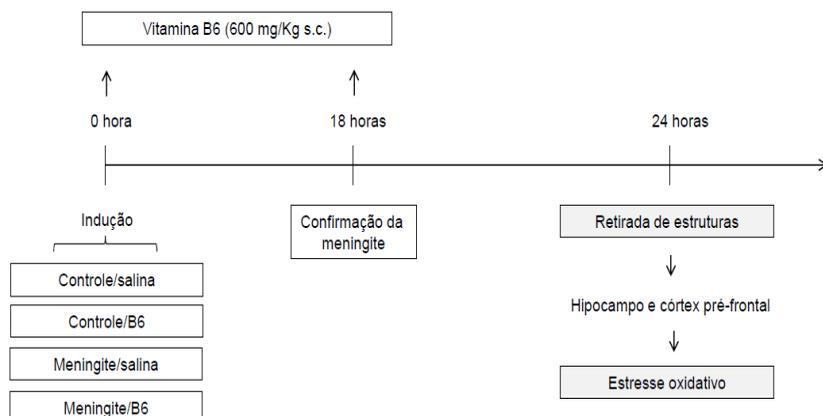


Figura 4: Representação da linha do tempo para a indução da meningite, tratamento adjuvante com vitamina B6 e morte dos animais em 24 horas para parâmetros de estresse oxidativo.

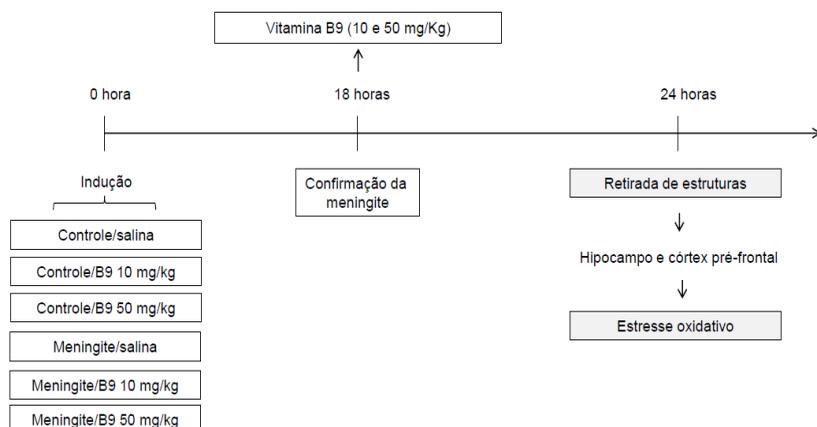


Figura 5: Representação da linha do tempo para a indução da meningite, tratamento adjuvante com vitamina B9 e morte dos animais em 24 horas para parâmetros de estresse oxidativo.

Para avaliação da integridade da BHE os animais receberam tratamento com vitamina B6 ou B9 imediatamente após a indução e foram submetidos à técnica do corante de azul de *Evans* e mortos em 12, 18 e 24 horas após a indução da meningite pneumocócica (figura 6).

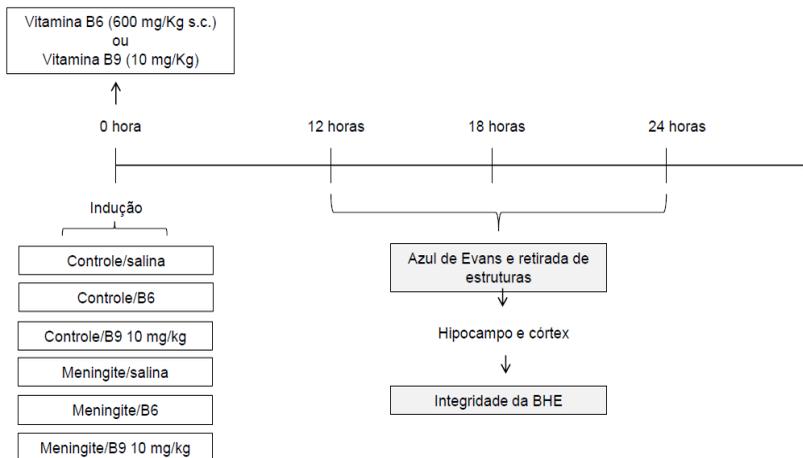


Figura 6: Representação da linha do tempo para a indução da meningite, tratamento adjuvante e morte dos animais para avaliação da integridade da BHE.

Para os testes comportamentais os animais receberam tratamento com antimicrobiano Ceftriaxona iniciando em 18 horas se mantendo por 7 dias, 2 vezes ao dia após a indução da meningite. A vitamina B6 foi administrada em 0 e 18 horas por via subcutânea e a vitamina B9 teve o início do tratamento em 18 horas após a indução se mantendo por 7 dias, 1 vez ao dia, via oral (gavagem) (figura 7 e 8, respectivamente).

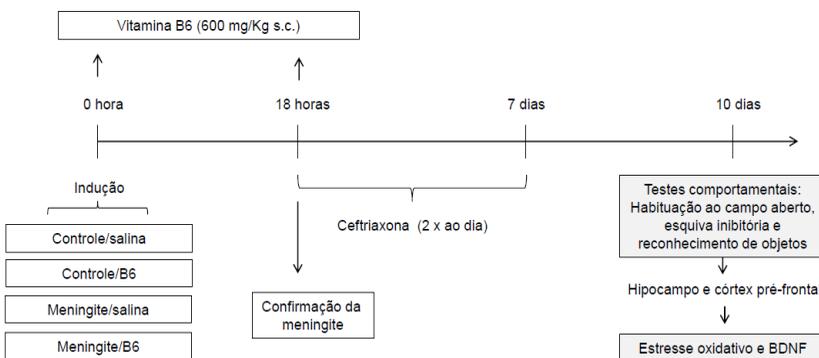


Figura 7: Representação da linha do tempo para a indução da meningite, tratamento adjuvante com vitamina B6, testes comportamentais e morte dos animais para parâmetros de estresse oxidativo e níveis de BDNF.

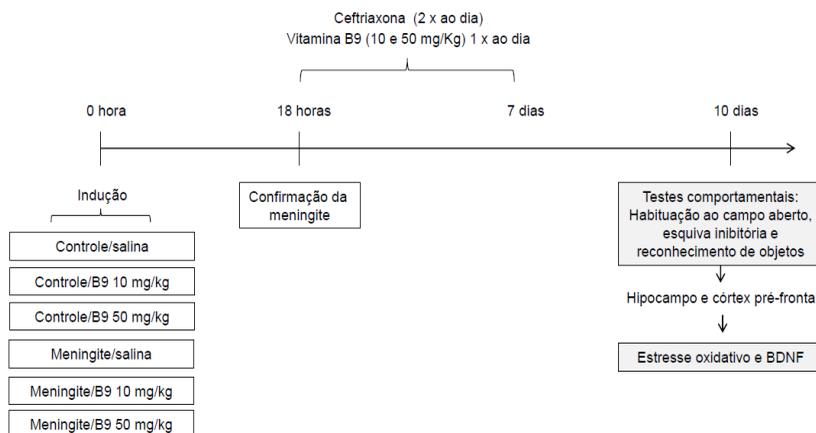


Figura 8: Representação da linha do tempo para a indução da meningite, tratamento adjuvante com vitamina B9, testes comportamentais e morte dos animais para parâmetros de estresse oxidativo e níveis de BDNF.

3.9 TESTES BIOQUÍMICOS

3.9.1 Avaliação de danos oxidativos e defesa enzimática

3.9.1.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como índice 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 absorbância em 535 nm.

3.9.1.2 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 dinitrofenilidrazina. Os grupamentos carbonil foram medidos pela absorbância em 370 nm.

3.9.1.3 Atividade da mieloperoxidase

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 H₂O₂. A atividade foi medida espectrofotometricamente, como a variação de absorvância a 650 nm a 37 °C (De Young et al., 1989).

3.9.1.4 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 (Alshammari et al., 2012).

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

A atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorvância 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).

3.9.1.6 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., 2007a; 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 9).

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 teste). Durante 5 minutos, em ambas as sessões, foram observadas e documentadas todas as vezes que o animal cruzar as linhas pretas (*crossings*) ou se apoiar 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).

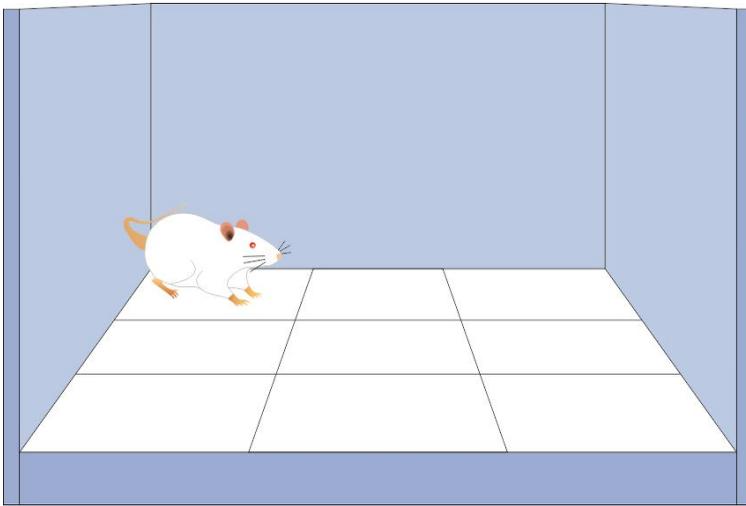


Figura 9: Teste de habituação ao campo aberto. Figura elaborada pelo autor, 2017.

3.10.2 Esquiva inibitória

O teste de esquiva inibitória foi realizado em um aparato que consiste em uma caixa de acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm (Albarsch, Porto Alegre, Brasil), cujo piso é formado por 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 será colocada junto à parede esquerda do aparelho (figura 10). Na sessão treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo que estes levaram para descer sobre as grades com as quatro patas foi medido com um dispositivo automático. Imediatamente após tocarem com as quatro patas na grade, os animais receberam um choque de 0,4 mA durante 2 segundos e voltaram à sua gaiola de origem. A sessão teste de curta duração foi realizada 1,5 h após o treino (memória de curta duração). A sessão teste de longa duração foi realizada 24 h após a sessão treino (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 aplicado o choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003). O teste de esquiva inibitória avalia a memória aversiva do animal. O aparato e os procedimentos têm sido descritos em

estudos anteriormente publicados (Quevedo et al., 1997; Roesler et al., 2003).

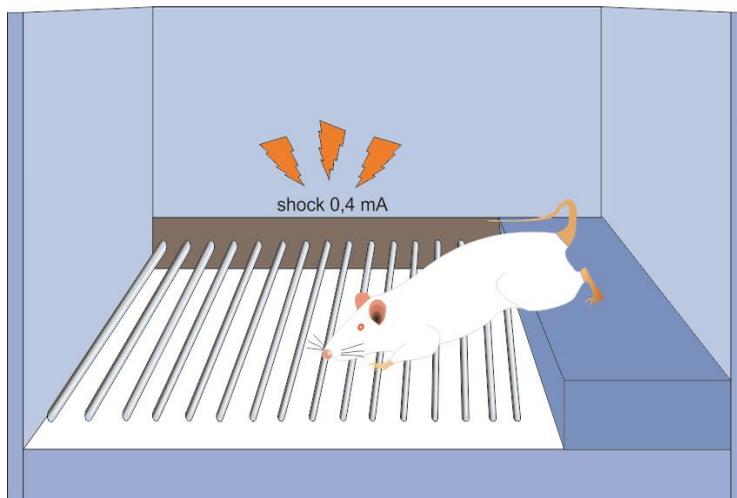


Figura 10: Teste de esquila inibitória. Figura elaborada pelo autor, 2017.

3.10.3 Memória de reconhecimento de objetos

No primeiro dia foi realizado o treino, onde o animal foi colocado cuidadosamente no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, no qual explorará o ambiente por 5 minutos. O primeiro dia serve como habituação do animal. No segundo dia o animal foi recolocado no aparato, no qual estão dois objetos iguais. O objeto A e objeto B (forma, tamanho e cor), contou-se o tempo que o animal explorou cada objeto (A e B). No mesmo dia, 1 hora e 30 minutos foi avaliada a memória de curta duração, o animal explorou novamente o ambiente na presença do primeiro objeto familiar (objeto A) e o novo objeto (objeto C), contou-se novamente o tempo total que o animal explorou cada objeto (De Lima et al., 2005). No dia seguinte (24 horas após) avaliou-se memória de longa duração onde foi feito o mesmo procedimento trocando o objeto C pelo objeto D (diferente do objeto A), contou-se o tempo de exploração de cada objeto (figura 11). Este teste avaliou as memórias de curta e longa duração.

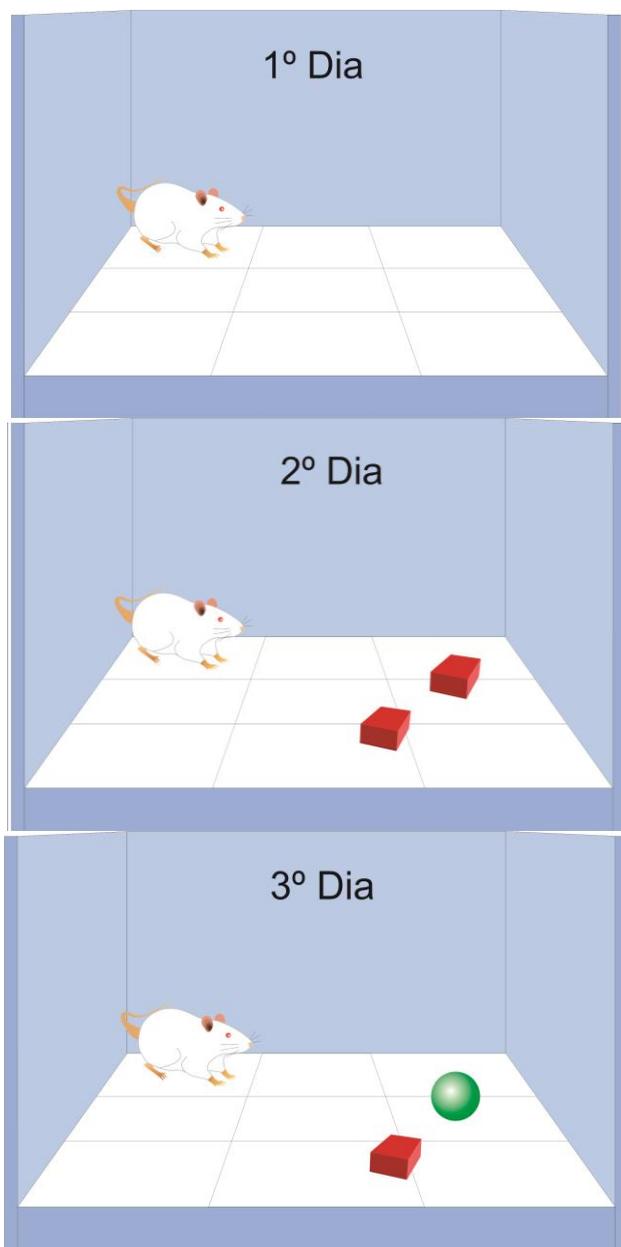


Figura 11: Teste de reconhecimento de objetos. Figura elaborada pelo autor, 2017.

3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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

Para as análises bioquímicas de estresse oxidativo, BHE e BDNF, os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste *post hoc* Tukey. Dados da tarefa de habituação ao campo aberto serão relatados como média \pm EPM, e as comparações dentro os grupos foram feitas utilizando-se teste *t* de Student pareado. Dados da tarefa de esquivas inibitória e reconhecimento de objetos foram realizados pelo teste U-Mann-Whitney. As comparações dentro dos grupos serão realizadas pelo teste de Wilcoxon. Em todas as comparações, $p < 0,05$ foi considerado significativamente estatístico. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 20.0.

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO 24 HORAS APÓS A INDUÇÃO EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B6

A figura 12 ilustra os efeitos da meningite pneumocócica sobre os níveis de TBARS (MDA), carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato, atividade das enzimas MPO, SOD e CAT no hipocampo de ratos Wistar adultos tratados com vitamina B6 24 horas após a indução de meningite. Os níveis de TBARS, carbonilação de proteínas e nitrito/nitrato foram aumentados no hipocampo dos animais do grupo meningite que receberam tratamento com salina quando comparados ao grupo controle/salina. Entretanto esse aumento foi revertido com o uso adjuvante de vitamina B6. A atividade de MPO foi aumentada no grupo meningite/B6 quando comparado ao grupo controle/salina. A vitamina B6 diminui a atividade dessa enzima nos animais que receberam tratamento adjuvante. A atividade da SOD foi diminuída no grupo meningite/salina, porém a vitamina B6 foi capaz de prevenir essa diminuição dos animais do grupo meningite/B6 quando comparados ao grupo meningite/salina. Não houve alterações significativamente estatísticas na atividade da CAT entre os grupos experimentais.

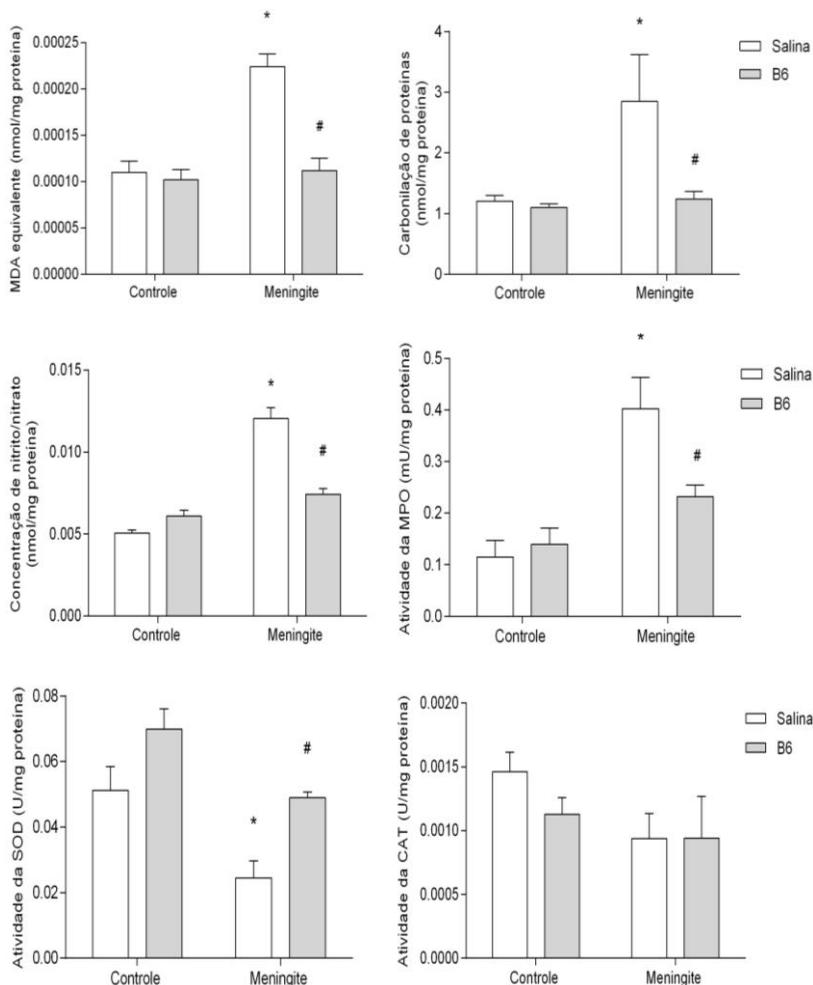


Figura 12: Avaliação dos níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no hipocampo de ratos Wistar adultos 24 horas após a indução de meningite pneumocócica com tratamento com vitamina B6. Os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Tukey. Os símbolos * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo controle/salina; # $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/salina.

Os níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato foram aumentados no córtex pré-frontal dos animais do grupo meningite com

tratamento com salina quando comparados ao grupo controle com salina. No entanto, a vitamina B6 foi capaz de diminuir esses parâmetros nos animais que receberam o tratamento adjuvante quando comparados ao grupo meningite tratado com salina. A atividade de MPO foi aumentada no grupo meningite/salina e diminuída no grupo meningite com tratamento com vitamina B6 (figura 13). A atividade de SOD se mostrou aumentada somente no grupo meningite/salina em comparação ao grupo controle/salina. Enquanto que a atividade de CAT foi diminuída nesse grupo e aumentada no grupo meningite/B6.

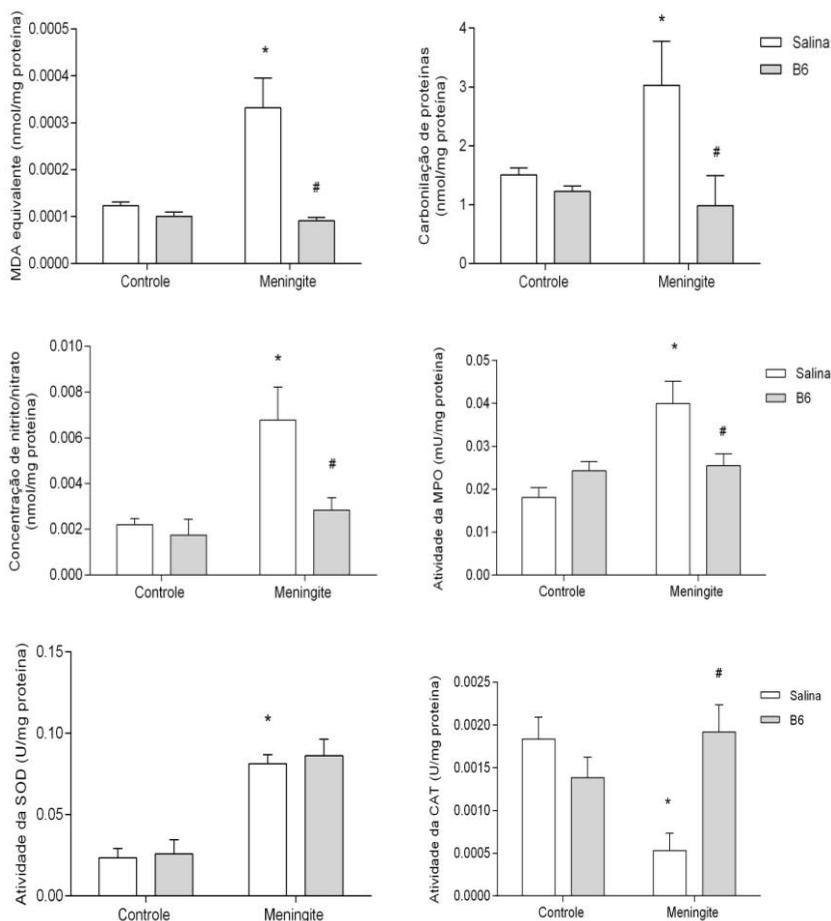


Figura 13: Avaliação dos níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, nitrato/nitrito e atividade MPO, SOD e CAT no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 24 horas após a indução de meningite pneumocócica com tratamento com vitamina B6. Os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Tukey. Os símbolos * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo controle/salina; # $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/salina.

4.2 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO 24 HORAS APÓS A INDUÇÃO EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B9

A figura 14 ilustra os parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo de ratos Wistar adultos 24 horas após a indução da meningite por *S. pneumoniae* que receberam tratamento com vitamina B9 nas doses de 10 e 50 mg/kg. Os níveis de TBARS foram aumentados no hipocampo dos animais do grupo meningite tratados com salina quando comparados ao grupo controle/salina. Os níveis de carboxilação de proteínas foi aumentado no hipocampo do grupo meningite/salina comparados ao grupo controle/salina e apenas a dose de vitamina B9 10 mg/kg foi capaz de prevenir esse aumento. As concentrações de nitrito/nitrato foram aumentadas no grupo meningite/salina e ambas as doses de vitamina B9 preveniram esse aumento. A atividade de MPO foi aumentada no grupo meningite/salina e diminuída no grupo meningite com tratamento adjuvante com vitamina B9 10 mg/kg. SOD teve sua atividade diminuída no grupo meningite/salina e o tratamento com vitamina B9 10 mg/kg foi capaz de prevenir essa diminuição.

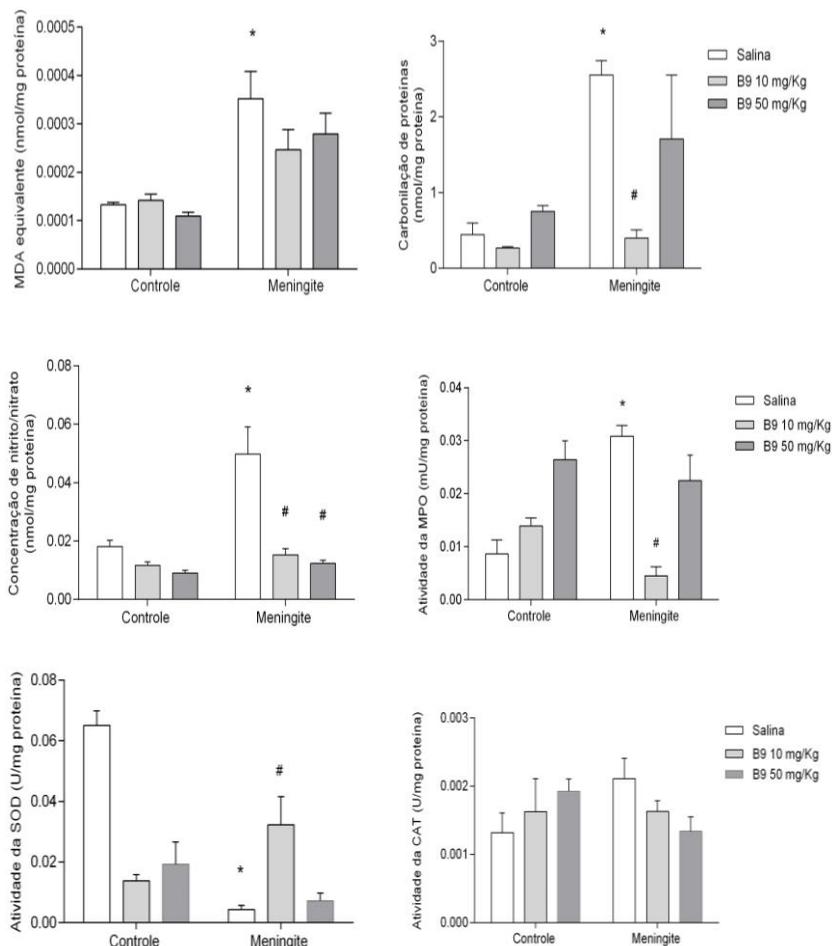


Figura 14: Avaliação dos níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no hipocampo de ratos Wistar adultos 24 horas após a indução de meningite pneumocócica com tratamento com vitamina B9. Os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Tukey. Os símbolos * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo controle/salina; # $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/salina.

A figura 15 ilustra os efeitos do tratamento adjuvante com vitamina B9 em 10 e 50 mg/kg sobre os parâmetros de estresse oxidativo no córtex pré-frontal de ratos Wistar 24 horas após submissão à meningite

pneumocócica. Os níveis de TBARS foram aumentados no córtex pré-frontal dos animais do grupo meningite/salina quando comparados ao grupo controle/salina e a dose de 10 mg/kg de vitamina B9 foi capaz de prevenir esse aumento. A carbonilação de proteínas e níveis de nitró/nitrato foi aumentada no grupo meningite/salina e ambas as doses de vitamina B9 revertem esse aumento. A atividade de MPO foi aumentada, enquanto que a atividade de SOD e CAT foi diminuída no grupo meningite/salina em comparação com o grupo controle/salina.

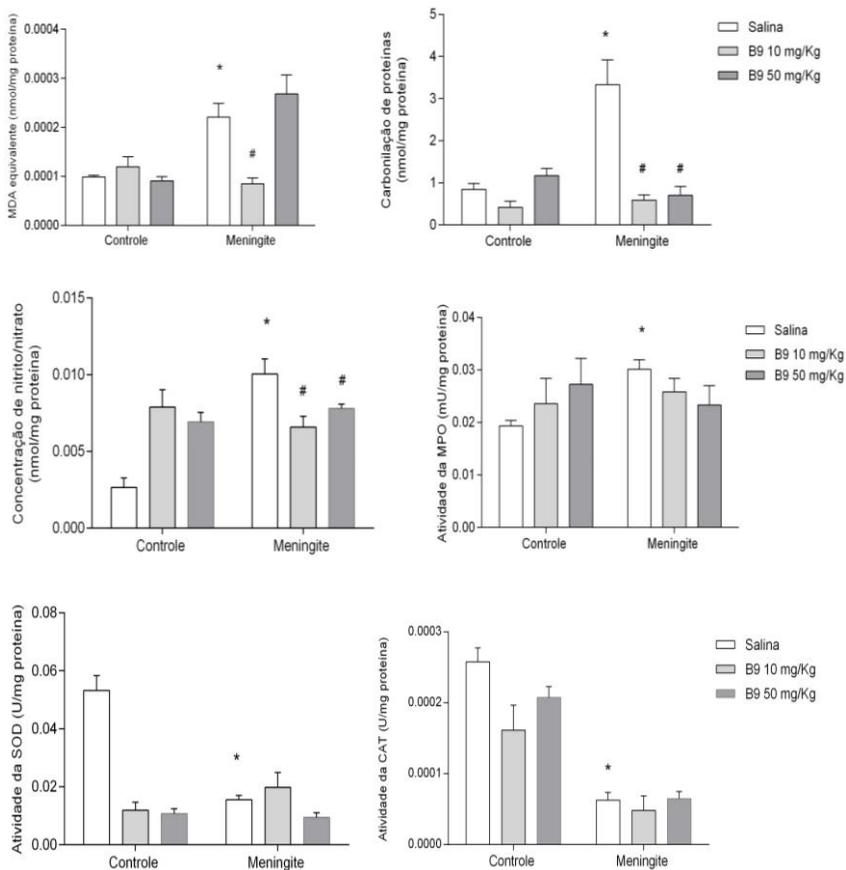


Figura 15: Avaliação dos níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, nitró/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 24 horas após a indução de meningite pneumocócica com

tratamento com vitamina B9. Os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Tukey. Os símbolos * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo controle/salina; # $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/salina.

4.3 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BHE

A integridade da BHE no hipocampo e no córtex foi avaliada usando a técnica de extravasamento do corante azul de Evans (figura 16). No hipocampo e córtex cerebral a quebra da BHE iniciou em 12 horas e se manteve até 24 horas após a indução ($p < 0,05$). O tratamento adjuvante com ambas as vitaminas foi capaz de prevenir a disfunção da BHE nos animais submetidos à meningite pneumocócica.

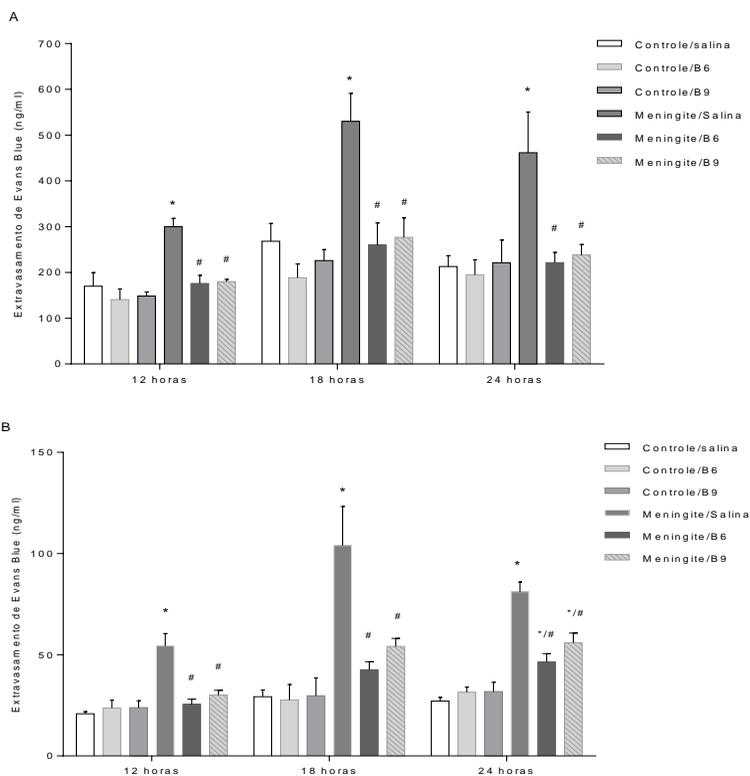


Figura 16: Integridade da BHE em animais submetidos à meningite por *S. pneumoniae* e tratados com vitamina B6 ou B9 (10 e 50 mg/kg). Hipocampo

(A), córtex (B). Os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Tukey. Os símbolos * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo controle/salina; # $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/salina.

4.4 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B6

Na tarefa de habituação ao campo aberto (figura 17), avaliamos a influência da vitamina B6 na memória de habituação 10 dias após a indução da meningite pneumocócica. Não houve diferenças no número de cruzamentos e levantamentos entre os grupos na sessão treino, demonstrando não haver diferença na atividade motora e exploratória entre os grupos. Na sessão teste, houve redução significativa nos cruzamentos e levantamentos no grupo controle, controle/B6 e meningite/grupo B6 quando comparado com a sessão treino, demonstrando memória de habituação nesses grupos ($p < 0,01$). Entretanto, o grupo meningite/salina não apresentou diferença na atividade motora e exploratória entre as sessões treino e teste, demonstrando comprometimento da memória de habituação nesse grupo.

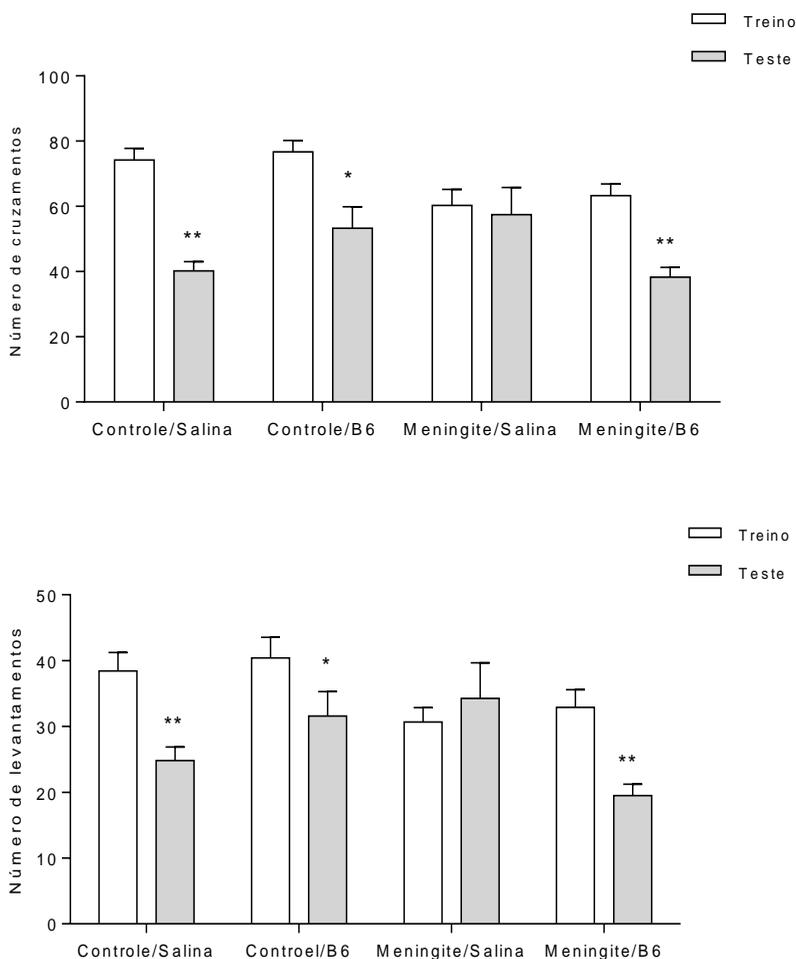


Figura 17: Teste de habituação ao campo aberto de ratos Wistar 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae* tratados com vitamina B6. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 10 animais por grupo e as comparações dentre os grupos foram feitas utilizando teste *t* de Student pareado. Dados do teste de esquila inibitória foram apresentados como mediana e intervalo interquartil, de 10 animais por grupo e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam significância estatística entre as sessões treino e teste.

A figura 18 mostra os resultados da tarefa de esQUIVA inibitória 10 dias após a indução da meningite pneumocócica. Houve diferença entre as sessões treino e teste no grupo controle, grupo controle/B6 e meningite/B6, demonstrando memória aversiva nesses grupos ($p < 0,05$). No grupo de meningite/salina não houve diferença entre as sessões treino e teste, demonstrando comprometimento da memória aversiva ($p > 0,05$).

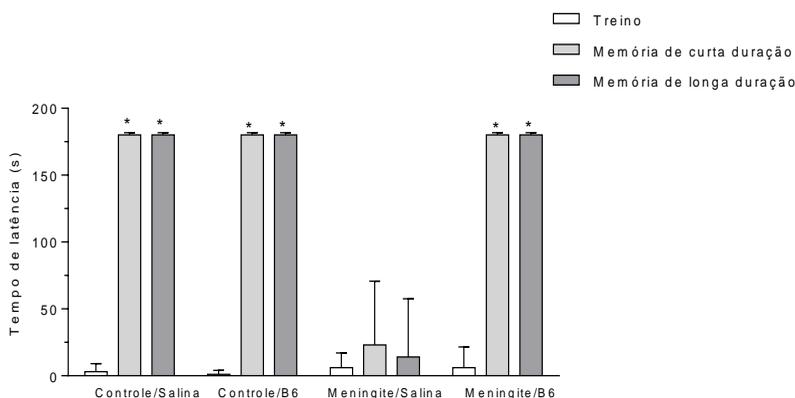


Figura 18: Teste de esQUIVA inibitória em ratos Wistar 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae* tratados com vitamina B6. Dados do teste de esQUIVA inibitória foram apresentados como mediana e intervalo interquartil, de 10 animais por grupo e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. * $p < 0,05$ indicam significância estatística entre as sessões treino e teste.

Na figura 19, observa-se o resultado do teste comportamental de reconhecimento de objetos, onde os animais do grupo meningite apresentaram prejuízo de memória de reconhecimento do objeto, ou seja, não utilizaram um tempo significativamente maior explorando o objeto novo, apresentando perda de memória de longo prazo. No entanto, os animais do grupo controle, controle/salina e meningite tratado com B6 apresentaram memória de longo prazo entre as sessões teste em comparação com a sessão treino.

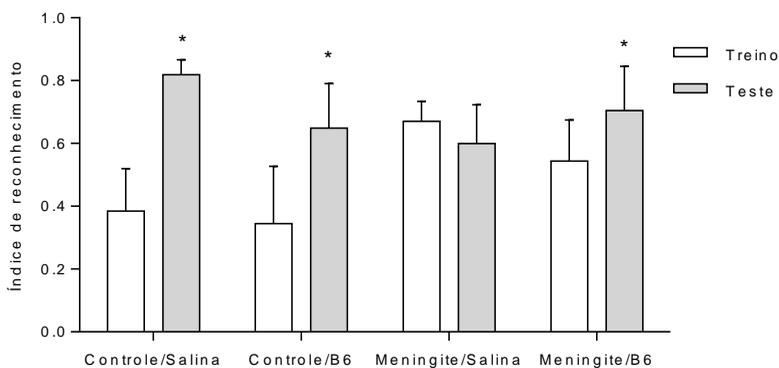


Figura 19: Teste de reconhecimento de objetos de ratos Wistar 10 dias após a indução da meningite pneumocócica tratados com vitamina B6. Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil, de 10 animais por grupo e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. As comparações dentro de cada grupo foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. * $p < 0.05$ indicam significância estatística entre as sessões treino e teste

4.5 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B9

A figura 20 ilustra a tarefa de habituação ao campo aberto e a influência da vitamina B9 na memória de habituação 10 dias após a indução da meningite pneumocócica. Houve uma diminuição no número de cruzamento e levantamentos no grupo meningite não tratado em comparação com todos os outros grupos, demonstrando comprometimento da memória de habituação nesse grupo ($p < 0,05$).

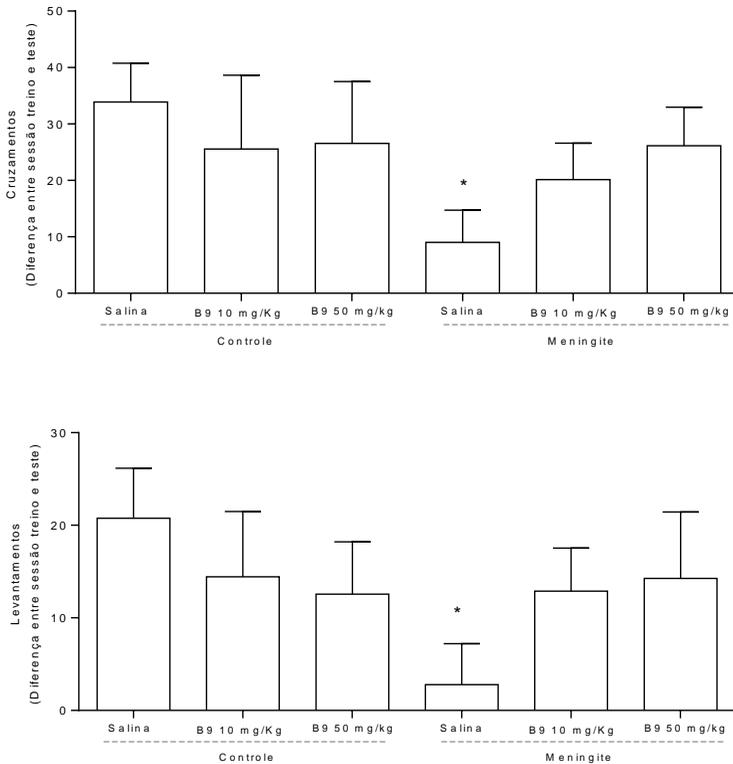


Figura 20: Teste comportamental de habituação ao campo aberto de ratos Wistar 10 dias após indução de meningite pneumocócica tratados com vitamina B9. O número de cruzamentos e levantamento são relatados como a diferença média (treino- teste) e o intervalo de confiança de 95% da diferença. Estes resultados foram analisados por teste *t* de Student pareado, com $n = 10$ animais por grupo. Os símbolos indicam significância estatística quando as sessões treino e teste foram comparadas (* $p < 0,05$).

A figura 21 mostra os resultados da tarefa esquiava inibitória 10 dias após a indução da meningite pneumocócica. Houve diferença entre as sessões treino e teste no grupo controle/salina, grupo controle/10 mg/kg, controle/50 mg/kg, grupo meningite/10 mg/kg e grupo meningite/50 mg/kg, demonstrando memória aversiva nesses grupos ($p < 0,05$). No grupo de meningite/salina, não houve diferença entre as sessões treino e

teste, demonstrando comprometimento da memória aversiva nesse grupo.

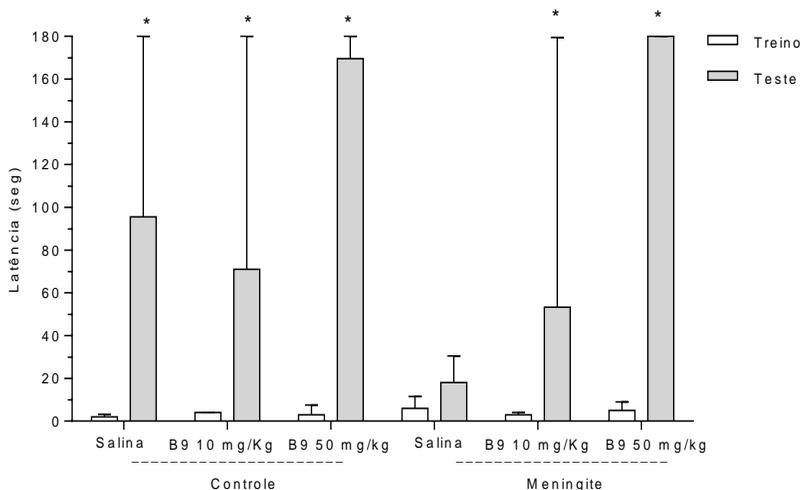


Figura 21: Teste de esQUIVA inibitória de ratos Wistar 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae* tratados com vitamina B9. Dados do teste de esQUIVA inibitória foram apresentados como mediana e intervalo interquartil, de 10 animais por grupo e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. * $p < 0.05$ indicam significância estatística entre as sessões treino e teste

A figura 22 apresenta o resultado do teste comportamental de reconhecimento de objetos, os animais do grupo controle/salina, controle/B9 10 mg/kg, controle/B9 50 mg/kg e meningite tratado com B9 10 e 50 mg/kg apresentaram memória de longo prazo entre as sessões teste em comparação com a sessão treino. O grupo meningite/salina não utilizou um tempo significativamente maior explorando o objeto novo, apresentando perda de memória de longo prazo.

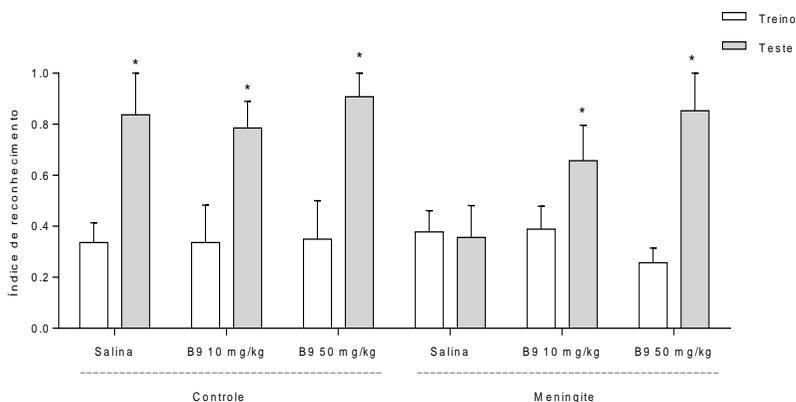


Figura 22: Teste de reconhecimento de objetos de ratos Wistar 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae* tratados com vitamina B9. Dados do teste de reconhecimento de objetos foram apresentados como mediana e intervalo interquartil, de 10 animais por grupo e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. As comparações dentro de cada grupo foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. * $p < 0.05$ indicam significância estatística entre as sessões treino e teste.

4.6 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B6

Na figura 23 pode-se observar os efeitos do tratamento adjuvante com vitamina B6 no hipocampo de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução de meningite pneumocócica. Os níveis de TBARS foram aumentados no hipocampo dos animais do grupo meningite/salina em comparação com o grupo controle/salina. Entretanto, o tratamento com vitamina B6 reverteu esse aumento. A carbonilação de proteínas foi aumentada nos animais do grupo meningite/salina quando comparados ao grupo controle/salina. Os níveis de nitrito/nitrato e a atividade de MPO foram aumentados no grupo meningite/salina e esse aumento foi revertido pelo uso da vitamina B6. Não houve diferença na atividade de SOD e CAT entre os grupos.

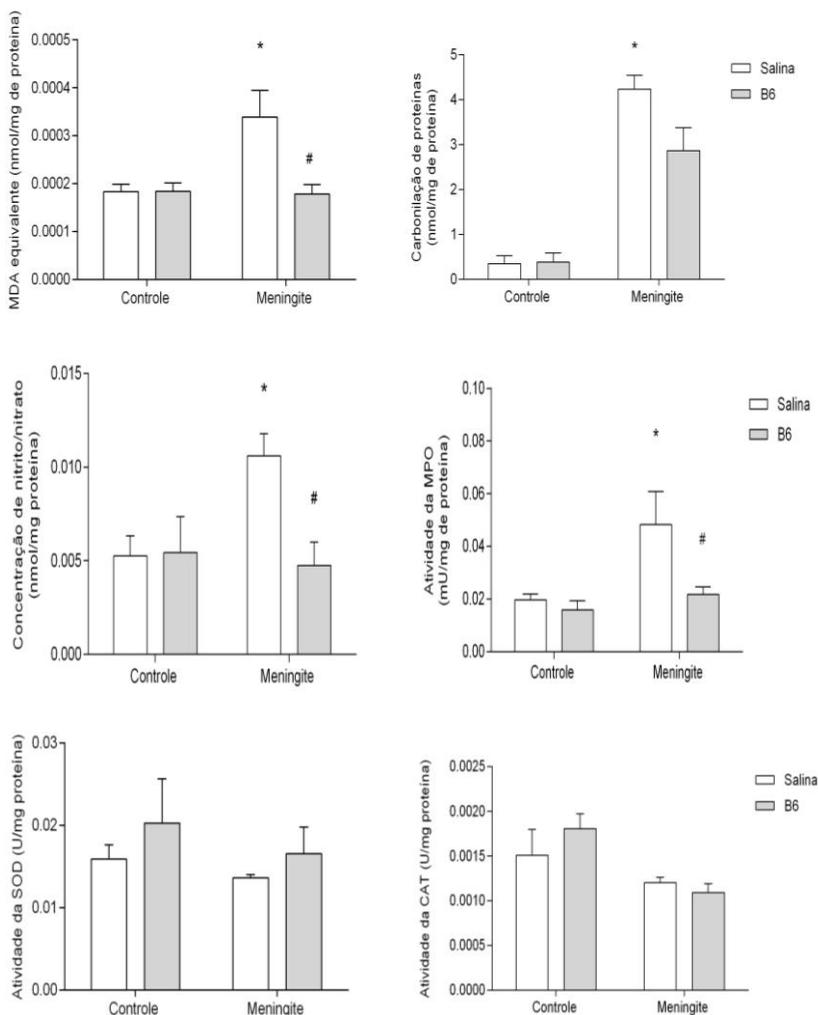


Figura 23: Avaliação dos níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no hipocampo de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução de meningite pneumocócica com tratamento adjuvante com vitamina B6. Os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Tukey. Os símbolos * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo controle/salina; # $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/salina.

Na figura 24 pode-se observar os efeitos do tratamento adjuvante com vitamina B6 no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução de meningite pneumocócica. Os níveis de TBARS e carbonilação de proteínas foram aumentados no grupo meningite/salina quando comparado ao grupo controle/salina. O tratamento com vitamina B6 foi eficiente em prevenir esse aumento. O mesmo aconteceu com a atividade de MPO que foi aumentada no grupo meningite/salina e o tratamento com vitamina B6 diminui a atividade dessa enzima. A atividade de SOD e CAT estava diminuída no grupo meningite/salina e foi aumentada no grupo que recebeu o tratamento com vitamina B6.

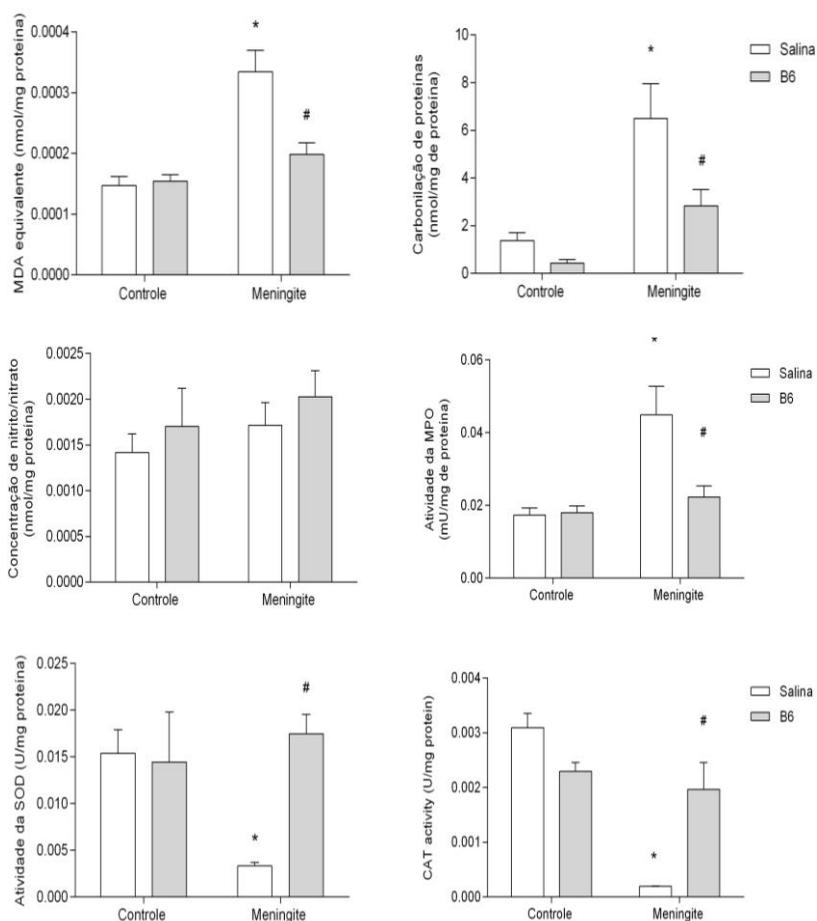


Figura 24: Avaliação dos níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução de meningite pneumocócica com tratamento adjuvante com vitamina B6. Os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Tukey. Os símbolos * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo controle/salina; # $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/salina.

4.7 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B9

A figura 25 mostra os efeitos da vitamina B9 sobre o dano oxidativo e a defesa enzimática no hipocampo 10 dias após a indução da meningite pneumocócica. Os níveis de TBARS diminuíram no hipocampo de animais que receberam tratamento adjuvante com 10 mg/kg da vitamina B9 ($p < 0,05$), enquanto que no grupo meningite que recebeu 50 mg/kg, os níveis de TBARS aumentaram em comparação com os níveis no grupo meningite/10 mg/kg ($p < 0,05$). Os níveis de carbonilação de proteínas e nitrito/nitrato diminuíram no hipocampo dos animais que receberam tratamento adjuvante com 10 mg/kg da vitamina B9 ($p < 0,05$). A atividade de MPO aumentou no hipocampo do grupo controle que recebeu tratamento adjuvante com 50 mg/kg de ácido fólico ($p < 0,05$), enquanto que o tratamento adjuvante diminuiu a atividade de MPO no hipocampo de animais do grupo meningite que receberam tratamento adjuvante com 10 mg/kg ($p < 0,05$). A atividade de SOD aumentou no hipocampo do grupo meningite que recebeu 10 mg/kg de vitamina B9 em comparação com o grupo de controle/salina ($p < 0,05$). A CAT não teve sua atividade alterada em nenhum dos grupos.

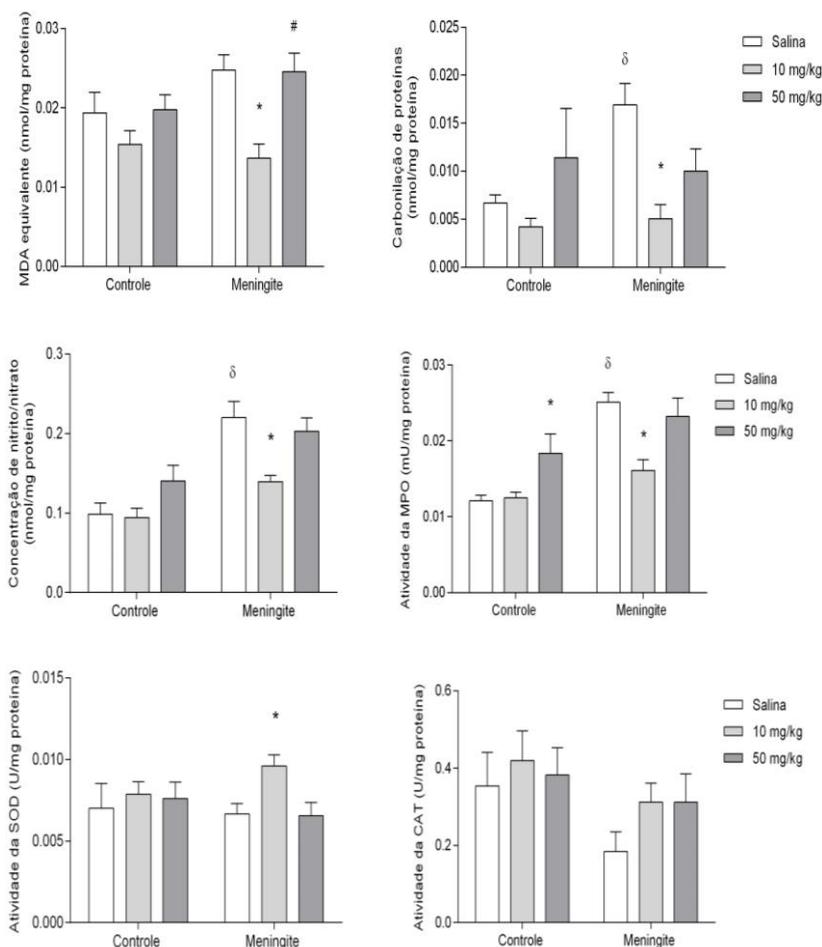


Figura 25: Avaliação dos níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, nitrato/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no hipocampo de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução de meningite pneumocócica com tratamento adjuvante com vitamina B9. Os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Tukey. Os símbolos * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo meningite/salina; # $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/B9 10 mg/kg. & $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo controle/salina.

A figura 26 mostra os efeitos da vitamina B9 sobre o dano oxidativo e a defesa enzimática no córtex pré-frontal 10 dias após a indução da meningite pneumocócica. Os níveis de TBARS diminuíram córtex pré-frontal dos animais que receberam tratamento adjuvante com 10 mg/kg de vitamina B9 ($p < 0,05$), enquanto que no grupo meningite que recebeu 50 mg/kg, os níveis de TBARS aumentaram em comparação com os níveis no grupo meningite/10 mg/kg ($p < 0,05$). Os níveis de carbonilação de proteínas diminuíram nos animais que receberam tratamento adjuvante com 10 mg/kg de ácido fólico ($p < 0,05$). Em contraste, no grupo meningite que recebeu 50 mg/kg de vitamina B9 tiveram seus níveis aumentados em comparação com os níveis do grupo meningite/10 mg/kg ($p < 0,05$). As concentrações de nitrito/nitrato não apresentaram diferença estatística entre os grupos. A atividade de MPO aumentou grupo meningite/salina e o tratamento com vitamina B9 não apresentou diferença ($p > 0,05$). A atividade de SOD e CAT diminui no grupo meningite/salina.

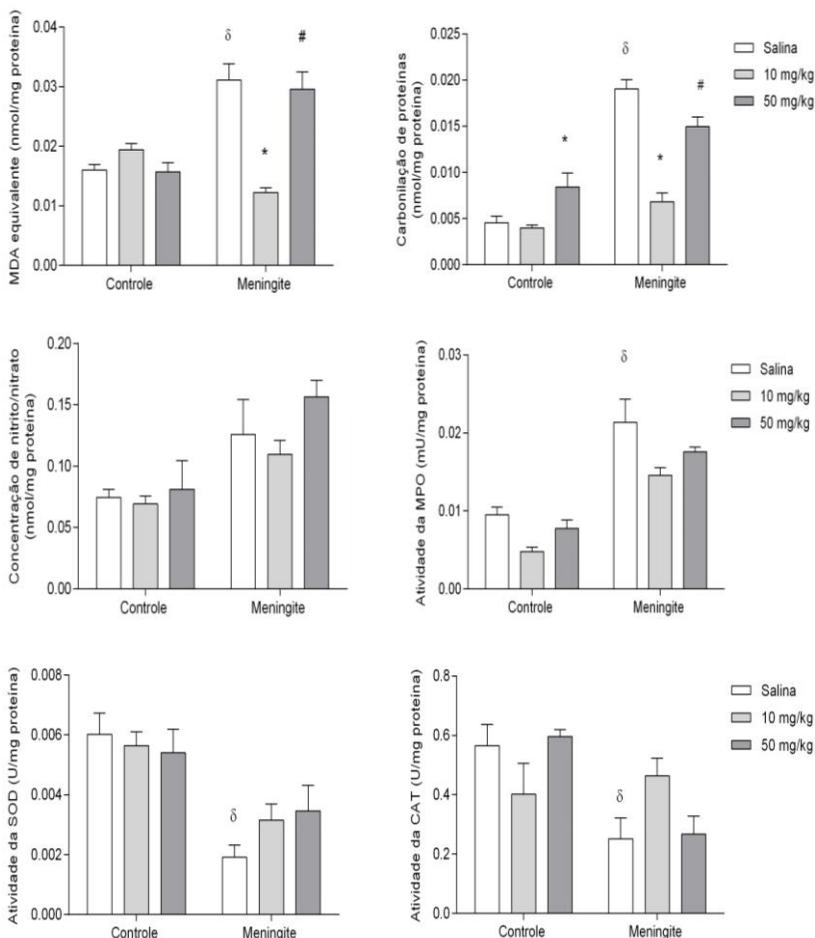


Figura 26: Avaliação dos níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade MPO, SOD e CAT no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução de meningite pneumocócica com tratamento adjuvante com vitamina B9. Os dados foram apresentados como média ± EPM e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc Tukey. * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo meningite/salina; # $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/B9 10 mg/kg. & $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo controle/salina.

4.8 NÍVEIS DE BDNF 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B6

A figura 27 mostra os níveis de BDNF no hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) 10 dias após a indução da meningite pneumocócica em animais tratados com vitamina B6. No hipocampo, os níveis de BDNF diminuíram no grupo meningite/salina em comparação ao grupo controle. O tratamento adjuvante com vitamina B6 aumentou os níveis de BDNF no grupo de meningite. Não houve alteração na expressão do córtex frontal do BDNF.

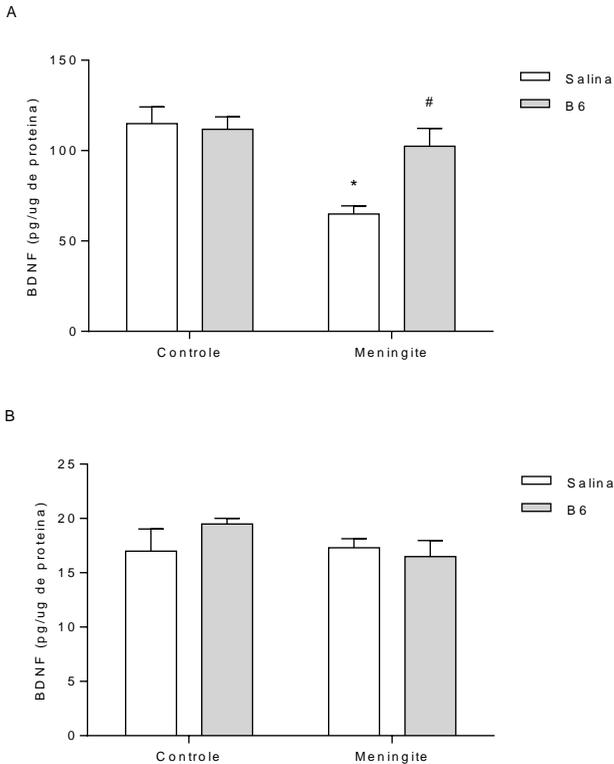


Figura 27: Níveis de BDNF no hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) de animais tratados com vitamina B6 10 dias após a indução de meningite

pneumocócica. Todos os dados são relatados como as médias \pm EPM. Estes resultados foram analisados por ANOVA de duas vias de *post-hoc* Tukey. Os símbolos * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo controle/salina; # $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/salina.

4.9 NÍVEIS DE BDNF 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO EM ANIMAIS TRATADOS COM VITAMINA B9

Na figura 28, apresenta os níveis de BDNF no hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) 10 dias após a indução da meningite pneumocócica. Os níveis de BDNF aumentaram no hipocampo do grupo de meningite que receberam tratamento adjuvante com 10 mg/kg de vitamina B9. No córtex pré-frontal, houve diminuição dos níveis de BDNF no grupo controle/50 mg/kg, grupo meningite/10 mg/kg e grupo meningite/50 mg/kg.

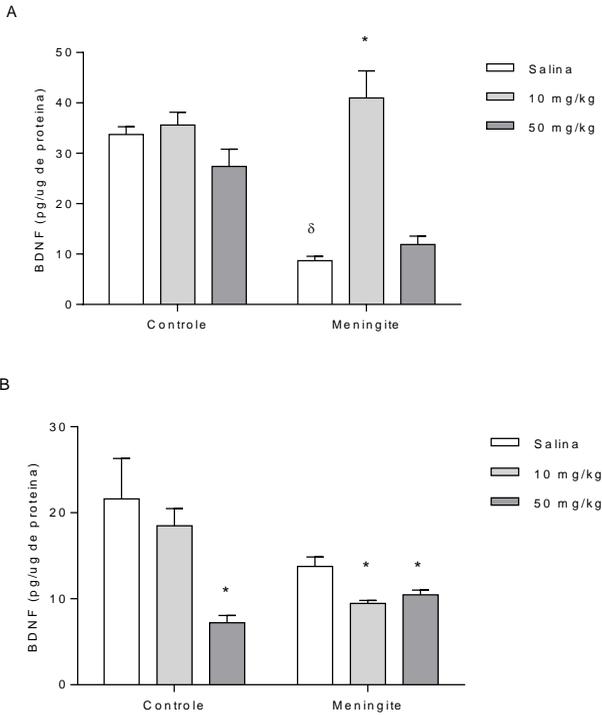


Figura 28: Níveis de BDNF no hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) de animais tratados com vitamina B9 10 dias após a indução de meningite pneumocócica. Todos os dados são relatados como as médias \pm EPM. Estes resultados foram analisados por ANOVA de duas vias de *post-hoc* Tukey. * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo controle/salina; & $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/salina com o controle/salina.

5 DISCUSSÃO

Durante os dois últimos séculos, poucos são os agentes infecciosos que tem acompanhado o impacto global do *S. pneumoniae* em termos de taxa de morbidade e mortalidade. Isso se deve a variedade de mecanismos de patogenicidade desse micro-organismo, entre eles estão a cápsula de polissacarídeo, uma exotoxina a pneumolisina, adesinas, hialuronidase, lipoproteínas e proteínas de superfície (Mitchell e Mitchell, 2010). O *S. pneumoniae*, após ultrapassar a BHE, multiplica-se no LCR facilmente, como se fosse cultivado em meio de cultura, alcançando títulos de até 10^9 UFCol/mL colonizando toda a superfície do cérebro e da medula espinhal (Zwijnenburg et al., 2006). Além disso, durante a sua fase de crescimento no espaço subaracnóide, o *S. pneumoniae* desencadeia uma intensa resposta imune, com liberação de componentes bacterianos que são altamente imunogênicos (Coimbra et al., 2006).

No presente estudo, foi demonstrada a influência da vitamina B6 e B9 na aprendizagem, memória, parâmetros de estresse oxidativo, integridade da BHE e nos níveis de BDNF após a indução meningite pneumocócica em modelo experimental. Em 24 horas após a indução da meningite houve um aumento dos níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, nitrito/nitrato e atividade da MPO no hipocampo e córtex pré-frontal; a atividade da SOD foi diminuída no hipocampo e aumentada no córtex pré-frontal e não houve diferença na atividade da CAT no hipocampo, enquanto que no córtex pré-frontal foi diminuída nos animais do grupo meningite que receberam tratamento com salina estéril. Em 10 dias após a indução, os parâmetros de estresse oxidativo se mantiveram aumentados. Os tratamentos com vitamina B6 e B9 foram capazes de prevenir estresse oxidativo, quebra da BHE, e além disso, essas vitaminas aumentaram os níveis de BDNF no hipocampo e de uma certa forma preveniram danos cognitivos em ratos Wistar adultos submetidos à meningite por *S. pneumoniae* 10 dias após a indução.

Esses dados corroboram com estudos anteriores de Barichello et al. (2010) em que foi demonstrado em animais adultos submetidos à meningite pneumocócica um aumento dos níveis de MDA, carbonilação de proteínas em hipocampo e córtex em 24 e 48 horas (Barichello et al., 2010c) e em 10 dias após a indução da meningite (Barichello et al., 2012c). A maioria das estratégias atuais para melhorar o desfecho da meningite pneumocócica implica na eliminação do micro-organismo

invasor sem exacerbar a resposta imune do hospedeiro. Um estudo prévio mostrou que 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*, os animais apresentaram comportamentos semelhantes à depressão e ansiedade, bem como déficits de memória e aprendizado (Barichello et al., 2010d).

Os mecanismos fisiopatológicos que são responsáveis por sequelas desencadeadas durante a meningite são complexos e permanecem pouco compreendidos. A inflamação do cérebro causada por *S. pneumoniae* é associada a uma resposta imune vigorosa. Experimentos anteriores também sugerem que as ERO estão, direta ou indiretamente, envolvidas no desenvolvimento de lesões neuronais (Leib et al., 1996a; Barichello et al., 2013a). Menezes et al. (2009) demonstraram fortes evidências do envolvimento de ERO no LCR de pacientes com meningite asséptica e bacteriana (De Menezes et al., 2009). O mecanismo antioxidante enzimático é considerado uma defesa primária contra macromoléculas biológicas causadoras de danos oxidativos. Ghielmetti et al. (2003) relatam que as atividades corticais de CAT, glutathione peroxidase ou glutathione redutase não foram alteradas durante a meningite (Ghielmetti et al., 2003), enquanto Menezes et al. (2009) relataram uma redução da atividade da glutathione no LCR, mas aumento da atividade da SOD em pacientes com meningite, sugerindo que não houve uma *up regulation* adaptativa nem uma inativação oxidativa dessas enzimas e que o aumento da atividade da SOD em ratos com meningite bacteriana está relacionada à ativação de neutrófilos e macrófagos para combater microorganismos bacterianos (De Menezes et al., 2009).

O desenvolvimento de um insulto estressante, independentemente da sua natureza (envelhecimento, desenvolvimento de patologias cardiovasculares, neurodegenerativas, doenças infecciosas, doenças do trato gastrointestinal, isquemia, hipóxia, entre outras) leva a uma deterioração do estado vitamínico. O efeito prejudicial sobre o sistema de defesa antioxidante é mais pronunciado em animais com deficiência isolada de vitaminas C, complexo B, A, E. A adição de vitaminas restaura o desempenho do sistema antioxidante. Assim, o papel das vitaminas na prevenção de estressores é evidente (Kodentsova et al., 2013).

Como já descrito anteriormente, a vitamina B9 tem um papel importante na neuroplasticidade e preservação da integridade neuronal (Kronenberg et al., 2009). A suplementação com vitamina B9 aumenta reparos do SNC em adultos (Iskandar et al., 2004). A ativação do sistema imune pode contribuir para a hiper-homocisteinemia em certas

doenças e em pacientes (Ploder et al., 2010). Consequentemente, a suplementação com vitaminas do complexo B é capaz de retardar o acúmulo de homocisteína. Dentre seus efeitos nos processos de oxidação *in vitro*, a homocisteína mostrou ser um potente composto pró-inflamatório que aumenta a produção de citocinas (McCully, 2007). Sabe-se que a hiper-homocisteinemia está diretamente relacionada ao estresse oxidativo. A autooxidação de homocisteína e outros dissulfetos libera oxigênio (O_2) e H_2O_2 , ambos prejudicam a função neuronal e predisõem distúrbios neuronais e psiquiátricos (White et al., 2001). A deficiência de vitamina B9 induz os altos níveis de homocisteína e a formação de ERO que levam à diminuição do potencial antioxidante, aumentando o dano oxidativo ao tecido (McCully, 2009). Budni et al. (2013) demonstraram efeito semelhantes aos aqui encontrados, onde a vitamina B9 atuou como antioxidante em modelo animal de depressão (Budni et al., 2013). A suplementação com vitamina B9 mostrou efeitos protetores sobre os danos oxidativos e dano cognitivo encontrado, também, em modelo animal de esquizofrenia induzido por ketamina (Zugno et al., 2016). Brocardo et al. (2010) mostraram efeito protetor da vitamina B9 administrada por um período de 7 dias sobre dano lipídico induzido pela ouabaína, corroborando os achados do presente estudo (Brocardo et al., 2010).

A vitamina B6 preveniu a geração de radicais de oxigênio e a peroxidação lipídica causada pelo H_2O_2 (Kannan e Jain, 2004) e a suplementação de vitamina B6 à dieta pode prevenir a elevação de marcadores de estresse oxidativo, como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e altos níveis de oxidação em proteínas em ratos homocisteinêmicos (Mahfouz et al., 2009). Embora o mecanismo antioxidante da vitamina B6 ainda não esteja bem elucidado, uma menor concentração dessa vitamina parece comprometer a capacidade antioxidante de um indivíduo. Recentemente, a associação entre maior estresse oxidativo e menor nível de vitamina B6 foi observada em indivíduos idosos (Shen et al., 2010), o que pode sugerir a potente capacidade antioxidante da vitamina B6 em humanos. O papel exato que os compostos de vitamina B6 desempenham como antioxidantes ainda não estão claros. No entanto, eles podem mediar através de mecanismo direto ou indireto (Ehrenshaft et al., 1999). O possível mecanismo direto pode ser que os grupos de compostos de vitamina B6 tenham ambos os grupos, hidroxil e amina, substituídos em um anel piridina que pode reagir com os radicais peroxi e, assim, eliminar radicais e peroxidação lipídica (Keles et al., 2010). A PLP no plasma serve como uma

coenzima para cistationina β sintase e cistationina γ liase, ambos os quais são necessários para a síntese de cisteína. A cisteína sintetizada por esta via contribui para a síntese de glutatona. O mecanismo indireto pelo qual os compostos de vitamina B6 desempenham o papel de antioxidantes pode ser por atuarem como coenzimas no sistema de defesa antioxidante da glutatona (Cheng et al., 2013). Estudos relataram que a vitamina B6 exerceu efeito antioxidante e reduziu o superóxido e peroxidação lipídica induzidos por H_2O_2 em cultura de células endoteliais vasculares (Mahfouz et al., 2009), dados esses que também está de acordo com nossos achados na meningite.

Uma das principais e primeiras consequências da meningite pneumocócica é a quebra da BHE. Em 2012, nosso grupo de pesquisa mostrou em modelo experimental de meningite pneumocócica com ratos adultos, que a quebra da BHE ocorreu 12 h após a indução (Barichello et al., 2012b), após a produção de citocinas (Barichello et al., 2010b). As ERO e de nitrogênio têm sido implicadas como mediadores da degradação da BHE (Klein et al., 2006), sugerindo que o aumento da permeabilidade BHE pode estar relacionado com a presença de NO^* e O_2^* (Mayhan, 2000).

A produção de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão celular induz citotoxicidade e apoptose em células endoteliais microvasculares. Este processo permite a translocação bacteriana através da BHE (Kim, 2003). A própria BHE segrega citocinas, prostaglandinas, NO^* (Fabry et al., 1993) e, devido à natureza da BHE, essas substâncias podem ser enviadas ao SNC ou para o sangue (Verma et al., 2006). A neuroinflamação está associada a uma maior permeabilidade da BHE e lesão cerebral (Candelario-Jalil et al., 2007). No presente estudo, a quebra da BHE foi observada em ambas as estruturas cerebrais, hipocampo e córtex, iniciando a quebra em 12 horas e mantendo-se até 24 horas após a indução. Grandgirard et al. (2007), documentaram o pico de apoptose no giro denteado do hipocampo em 30 horas, seguido por uma diminuição, retornando aos níveis basais em 40 horas, após a indução de meningite pneumocócica (Grandgirard et al., 2007b). Também verificamos que a degradação da BHE retornou aos parâmetros basal próximo a este horário. O tratamento adjuvante com as vitaminas B6 e B9 (10 mg/Kg) foi capaz de prevenir a quebra da BHE no hipocampo e córtex em 12, 18 e 24 horas após a indução da meningite por *S. pneumoniae*.

Além disso, os animais submetidos à meningite pneumocócica apresentaram diminuição dos níveis de BDNF e prejuízos nas memórias

de habituação, inibitória e de reconhecimento de objetos novos 10 dias após a indução. O estresse oxidativo contribui para a degeneração neuronal e pode estar associado a comprometimento cognitivo no processo de envelhecimento e em doenças neurodegenerativas como a esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, depressão (Lindqvist et al., 2016) e algumas doenças periféricas como a distrofia muscular de Duchenne (Comim et al., 2009). Na sepse, o estresse oxidativo está diretamente correlacionado com o comprometimento cognitivo em um modelo animal (Barichello et al., 2009). As ERO podem causar danos aos lípidos, proteínas, carboidratos ou ácidos nucleicos, aumentando o risco de sequelas particularmente no hipocampo (Hoogman et al., 2007). No presente estudo, verificou-se que em animais submetidos à meningite pneumocócica o tratamento adjuvante com vitamina B6 preveniu o comprometimento cognitivo e aumentou a expressão de BDNF no hipocampo. Em um estudo de Barichello e colaboradores foi evidenciado uma correlação entre os baixos níveis de BDNF e a presença de déficits comportamentais em ratos submetidos à meningite neonatal (Barichello et al., 2010a).

A apoptose de células no giro dentado do hipocampo é uma forma característica de lesão cerebral na meningite bacteriana (Bifrare et al., 2003). Em modelo experimental, uma associação entre lesão hipocampal e déficits de aprendizagem e memória foi evidenciada (Loeffler et al., 2001). Um estudo demonstrou que o tratamento com vitamina B6 reduziu o número de células apoptóticas no giro dentado do hipocampo (Zysset-Burri et al., 2013).

A neurogênese, produção contínua de novos neurônios ocorre no giro dentado do hipocampo e é influenciada por situações patológicas como isquemia ou inflamação. A meningite bacteriana pode afetar a produção de fatores de sobrevivência neuronal como o BDNF. Estudos demonstraram que a expressão do BDNF e do seu receptor TrkB está aumentada nos neurônios durante a fase aguda da meningite pneumocócica (Grimwood et al., 2000). O BDNF co-localiza-se com células que expressam TrkB no hipocampo e o hilo adjacente à zona subgranular do giro dentado onde a proliferação de células progenitoras está aumentada. Esses achados indicam um envolvimento da sinalização endógena de BDNF e TrkB na neurogênese após meningite bacteriana (Wittwer et al., 2010). No entanto, a persistência de sequelas neurológicas em até 50% dos sobreviventes sugere que os mecanismos endógenos responsáveis pela neuroregeneração são ineficientes (Mook-

Kanamori et al., 2011). Uma vez que o tratamento com BDNF exógeno resulta na redução de morte celular em meningite pneumocócica experimental (Bifrare et al., 2005), notou-se que o nível de expressão regulado de BDNF em animais tratados com vitamina B6 desempenha um papel importante na diminuição da apoptose do hipocampo (Zysset-Burri et al., 2013).

A meningite pneumocócica leva ao acúmulo de metabólitos da quinurenina no cérebro com uma correlação positiva entre a concentração de metabólitos da quinurenina e a extensão dos danos apoptóticos no hipocampo (Bellac et al., 2006b). O uso de um inibidor da atividade daIDO preveniu o comprometimento cognitivo por meio da interrupção da via da quinurenina (Barichello et al., 2013b).

Estudos anteriores mostraram que uma baixa concentração de vitamina B6 no plasma está relacionada com o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Friso et al., 2001). A expressão de BDNF em células neuronais é induzida pela ativação de canais de cálcio e pelo recrutamento de fatores de transcrição sensíveis ao cálcio (Viviani et al., 2005). O aminoácido excitatório glutamato é aumentado no fluido intersticial do cérebro durante meningite bacteriana (Leib et al., 1996b) e induz um influxo de cálcio por ligação ao receptor NMDA e, portanto, pode estimular a produção de BDNF (Mattson, 2008). Pelo contrário, ácido quinurênico, o intermediário neuroprotetor da via quinurenina, é um antagonista do receptor NMDA e, portanto, inibe o influxo de cálcio. Além disso, estudos *in vitro* usando terminais nervosos de córtex cerebral de ratos mostraram que a vitamina B6 inibe a liberação de glutamato através da supressão do influxo de cálcio (Yang e Wang, 2009).

O tratamento com vitamina B9 (10 mg/Kg) também aumentou os níveis de BDNF no hipocampo e preveniu dano de memória em animais induzidos à meningite pneumocócica. Essa vitamina desempenha um papel crucial na regulação da neurogênese, proliferação e diferenciação de células do SNC (Dhaulakhandi et al., 2010). Fornece o substrato para reações de metilação intracelular que são essenciais para o desenvolvimento normal das funções cerebrais. A metilação é importante para a síntese e reparo do DNA, expressão gênica, síntese e a degradação da neurotransmissão e o metabolismo da homocisteína (Frankenburg, 2007). Em modelo animal de lesão da medula espinhal o tratamento com vitamina B9 melhorou significativamente os resultados do teste comportamental, aumentou a expressão de BCL-2, reduziu a expressão de Bax e caspase-3, inibiu a apoptose, aumentou os níveis de

BDNF, GDNF e NT-3 e nutriu células nervosas ao redor do foco de lesões (Zhang e Shen, 2015).

A hiper-homocisteinemia emergiu como um importante fator de risco para doenças neurodegenerativas e vasculares (Sachdev, 2005). A memória é um processo dinâmico que consiste em pelo menos três fases: aquisição, consolidação e recuperação (Izquierdo, 2002). Há evidências que sugerem que as memórias são armazenadas em sinapses cerebrais e que a plasticidade sináptica pode ser o mecanismo celular de aprendizagem e memória (Lu et al., 2008). A memória pode ser classificada por sua duração: a memória de curta duração (MCD), que dura DE minutos a 1 - 3 horas e a memória de longo prazo (MLD), que dura horas, dias ou anos. O BDNF está largamente implicado no processo de consolidação de MCD e MLD (Bekinschtein et al., 2008). A secreção de BDNF é regulada pela atividade neuronal, o que significa que ela atua localmente e especificamente em sinapses ativas, modulando a atividade sináptica e a conectividade neural (Bekinschtein et al., 2008). A hiper-homocisteinemia prejudica a memória em modelos experimentais e tem sido relacionada à disfunção cognitiva em seres humanos. Reis et al. (2002) mostraram que hiper-homocisteinemia prejudica a MLD na tarefa de esQUIVA inibitória (Reis et al., 2002).

Foi sugerido que a redução do BDNF pode estar relacionada ao estresse oxidativo (Kapczinski et al., 2008). Zou e Crews (2006) demonstraram que o estresse oxidativo, bem como neurotoxicidade induzida pelo glutamato, reduziu a expressão do mRNA do BDNF (Zou e Crews, 2006). Por outro lado, relatos mostram que hiper-homocisteinemia provoca dano oxidativo pela ativação de receptores glutamatérgicos, com conseqüente geração de ERO (Zieminska e Lazarewicz, 2006) ou por autoxidação a da homocistina e outros dissulfuretos liberando O_2^\bullet e H_2O_2 (Dayal et al., 2004). Neste contexto, foi demonstrado que hiper-homocisteinemia induz danos oxidativos no hipocampo de ratos, aumentando a peroxidação lipídica e diminuindo as defesas antioxidantes (Streck et al., 2003). A redução da concentração de BDNF no hipocampo durante a consolidação da memória induzida por hiper-homocisteinemia pode ser um resultado de dano oxidativo e provavelmente afeta negativamente as vias de sinalização do BDNF, contribuindo para o comprometimento na consolidação da memória na tarefa de esQUIVA inibitória em modelo animal com administração de homocisteína (Matte et al., 2009).

6 Conclusão

As infecções bacterianas no SNC são doenças graves. Muito têm sido aprendido e pesquisado sobre os patógenos, epidemiologia, patogenia destas infecções além da proteção limitada e efeitos prejudiciais da resposta inflamatória ao hospedeiro. No entanto, o progresso no que diz respeito ao tratamento e uma melhor evolução têm sido lentos. Uma compreensão mais detalhada do processo fisiopatológico da meningite por *S. pneumoniae*, da indução da resposta inflamatória do hospedeiro e de seus efeitos é sem dúvida desejável e indispensável. 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. O tratamento adjuvante com vitamina B6 e vitamina B9 exerceu efeitos neuroprotetores através do aumento da expressão do BDNF, prevenção de estresse oxidativo e atenuação do comprometimento da memória em animais submetidos à meningite pneumocócica. Embora o efeito desses processos necessite de mais investigação, a prevenção de dano cognitivo pelo uso de vitaminas pode ser promissora no tratamento de pacientes acometidos por meningite bacteriana.

REFERÊNCIAS

- Abraham AL, Focaccia R, Gattaz WF. Childhood meningitis increases the risk for adult schizophrenia. *World J Biol Psychiatry*. 2005;6(2):44-8.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
- 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.
- Alshammari J, Monnier P, Daniel RT, Sandu K. Clival chordoma with an atypical presentation: A case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2012;6:410.
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet*. 2005;365(9453):63-78.
- Arancibia S, Silhol M, Moulriere F, Meffre J, Hollinger I, Maurice T, Tapia-Arancibia L. Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. *Neurobiol Dis*. 2008;31(3):316-26.
- Astorg P, Couthouis A, de Courcy GP, Bertrais S, Arnault N, Meneton P, Galan P, Hercberg S. Association of folate intake with the occurrence of depressive episodes in middle-aged French men and women. *Br J Nutr*. 2008;100(1):183-7.
- Aycicek A, Iscan A, Erel O, Akcali M, Ocak AR. Oxidant and antioxidant parameters in the treatment of meningitis. *Pediatr Neurol*. 2007;37(2):117-20.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987;32:279-312.
- 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, Simoes LR, Silvestre T, Comim CM, Sachs D, Teixeira MM, Teixeira AL, Quevedo J. TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *J Neuroimmunol*. 2010b;221(1-2):42-5.
- Barichello T, Generoso JS, Silvestre C, Costa CS, Carrodore 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.* 2012a; 31(8):2005-9

Barichello T, Generoso JS, Silvestre C, Costa CS, Carrodore 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.* 2012b;31(8):2005-9.

Barichello T, Generoso JS, Simoes LR, Elias SG, Quevedo J. Role of oxidative stress in the pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Oxid Med Cell Longev.* 2013a;371465(10):9.

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

Barichello T, Santos AL, Savi GD, Generoso JS, Otaran P, Michelon CM, Steckert AV, Mina F, Comim CM, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Antioxidant treatment prevents cognitive impairment and oxidative damage in pneumococcal meningitis survivor rats. *Metab Brain Dis.* 2012c;27(4):587-93.

Barichello T, Santos AL, Savi GD, Generoso JS, Otaran P, Michelon CM, Steckert AV, Mina F, Comim CM, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Antioxidant treatment prevents cognitive impairment and oxidative damage in pneumococcal meningitis survivor rats. *Metab Brain Dis.* 2012d; 27(4):587-93.

Barichello T, Savi GD, Silva GZ, Generoso JS, Bellettini G, Vuolo F, Petronilho F, Feier G, Comim CM, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Antibiotic therapy prevents, in part, the oxidative stress in the rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *Neurosci Lett.* 2010c;478(2):93-6.

Barichello T, Silva GZ, Batista AL, Savi GD, Feier G, Comim CM, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Early antibiotic administration prevents cognitive impairment induced by meningitis in rats. *Neurosci Lett.* 2009;465(1):71-3.

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.* 2010d;117(7):819-26.

- Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 2004;84(3):869-901.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron.* 2007;53(2):261-77.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist.* 2008;14(2):147-56.
- Bellac CL, Coimbra RS, Christen S, Leib SL. Pneumococcal meningitis causes accumulation of neurotoxic kynurenine metabolites in brain regions prone to injury. *Neurobiol Dis.* 2006a;24(2):395-402.
- Bellac CL, Coimbra RS, Christen S, Leib SL. Pneumococcal meningitis causes accumulation of neurotoxic kynurenine metabolites in brain regions prone to injury. *Neurobiology of Disease.* 2006b;24(2):395-402.
- Bellac CL, Coimbra RS, Christen S, Leib SL. Inhibition of the kynurenine-NAD⁺ pathway leads to energy failure and exacerbates apoptosis in pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010;69(11):1096-104.
- 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.
- Bifrare YD, Gianinazzi C, Imboden H, Leib SL, Tauber MG. Bacterial meningitis causes two distinct forms of cellular damage in the hippocampal dentate gyrus in infant rats. *Hippocampus.* 2003;13(4):481-8.
- Bifrare YD, Kummer J, Joss P, Tauber MG, Leib SL. Brain-derived neurotrophic factor protects against multiple forms of brain injury in bacterial meningitis. *J Infect Dis.* 2005;191(1):40-5.
- Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(9):724-31.
- Brandt CT. Experimental studies of pneumococcal meningitis. *Dan Med Bull.* 2010;57(1).
- Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR. Pneumococcal pneumolysin and H(2)O(2) mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest.* 2002;109(1):19-27.
- Brocardo Pde S, Budni J, Lobato KR, Kaster MP, Rodrigues AL. Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA

- receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Eur J Pharmacol.* 2008;598(1-3):37-42.
- Brocardo PS, Budni J, Pavesi E, Franco JL, Uliano-Silva M, Trevisan R, Terenzi MG, Dafre AL, Rodrigues AL. Folic acid administration prevents ouabain-induced hyperlocomotion and alterations in oxidative stress markers in the rat brain. *Bipolar Disord.* 2010;12(4):414-24.
- 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.
- Budni J, Lobato KR, Binfare RW, Freitas AE, Costa AP, Martin-de-Saavedra MD, Leal RB, Lopez MG, Rodrigues AL. Involvement of PI3K, GSK-3beta and PPARgamma in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. *J Psychopharmacol.* 2012;26(5):714-23.
- Budni J, Romero A, Molz S, Martin-de-Saavedra MD, Egea J, Del Barrio L, Tasca CI, Rodrigues AL, Lopez MG. Neurotoxicity induced by dexamethasone in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line can be prevented by folic acid. *Neuroscience.* 2011;190:346-53.
- Budni J, Zomkowski AD, Engel D, Santos DB, dos Santos AA, Moretti M, Valvassori SS, Ornell F, Quevedo J, Farina M, Rodrigues AL. Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. *Exp Neurol.* 2013;240:112-21.
- Candelario-Jalil E, Taheri S, Yang Y, Sood R, Grossetete M, Estrada EY, Fiebich BL, Rosenberg GA. Cyclooxygenase inhibition limits blood-brain barrier disruption following intracerebral injection of tumor necrosis factor-alpha in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;323(2):488-98.
- Cellini B, Montioli R, Oppici E, Astegno A, Borri Voltattorni C. The chaperone role of the pyridoxal 5'-phosphate and its implications for rare diseases involving B6-dependent enzymes. *Clinical Biochemistry.* 2014;47(3):158-65.
- Ceyhan M, Yildirim I, Balmer P, Borrow R, Dikici B, Turgut M, Kurt N, Aydogan A, Ecevit C, Anlar Y, Gulumser O, Tanir G, Salman N, Gurler N, Hatipoglu N, Hacimustafaoglu M, Celebi S, Coskun Y, Alhan E, Celik U, Camcioglu Y, Secmeer G, Gur D, Gray S. A prospective study of etiology of childhood acute bacterial meningitis, Turkey. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(7):1089-96.
- Cheng CH, Huang SC, Chiang TY, Wong Y, Huang YC. Higher plasma pyridoxal phosphate is associated with increased antioxidant enzyme

- activities in critically ill surgical patients. *Biomed Res Int*. 2013;572081(10):30.
- Coburn SP. Chapter 6 - Modeling Vitamin B6 Metabolism. In: STEPHEN, P. C. e DOUGLAS, W. T. (Ed.). *Advances in Food and Nutrition Research*; 1996. 107-32.
- Coburn SP. Vitamin B-6 Metabolism and Interactions with TNAP. In: FONTA, C. e NÉGYESSY, L. (Ed.). *Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP)*. Dordrecht; 2015. 207-38.
- Cohen-Cory S, Fraser SE. Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature*. 1995;378(6553):192-6.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917):885-91.
- Coimbra RS, Voisin V, de Saizieu AB, Lindberg RL, Wittwer M, Leppert D, Leib SL. Gene expression in cortex and hippocampus during acute pneumococcal meningitis. *BMC Biol*. 2006;4:15.
- Comim CM, Barichello T, Grandgirard D, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Leib SL. Caspase-3 mediates in part hippocampal apoptosis in sepsis. *Mol Neurobiol*. 2013;47(1):394-8.
- Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LC, Constantino LS, Petronilho F, Tuon L, Vainzof M, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Oxidative variables and antioxidant enzymes activities in the mdx mouse brain. *Neurochem Int*. 2009;55(8):802-5.
- Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*. 1995;377(6548):435-8.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003;329(1-2):23-38.
- Dayal S, Arning E, Bottiglieri T, Boger RH, Sigmund CD, Faraci FM, Lentz SR. Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke*. 2004;35(8):1957-62.
- 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 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 Souza FR, Fontes FL, da Silva TA, Coutinho LG, Leib SL, Agnez-Lima LF. Association of kynurenine aminotransferase II gene C401T polymorphism with immune response in patients with meningitis. *BMC Med Genet.* 2011;12(51):1471-2350.
- 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.
- Dhaulakhandi DB, Rohilla S, Rattan KN. Neural tube defects: review of experimental evidence on stem cell therapy and newer treatment options. *Fetal Diagn Ther.* 2010;28(2):72-8.
- Dhobale M, Joshi S. Altered maternal micronutrients (folic acid, vitamin B(12)) and omega 3 fatty acids through oxidative stress may reduce neurotrophic factors in preterm pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25(4):317-23.
- Doran KS, Fulde M, Gratz N, Kim BJ, Nau R, Prasadarao N, Schubert-Unkmeir A, Tuomanen EI, Valentin-Weigand P. Host-pathogen interactions in bacterial meningitis. *Acta Neuropathol.* 2016;131(2):185-209.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
- Ehrenshaft M, Bilski P, Li MY, Chignell CF, Daub ME. A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B6 biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(16):9374-8.
- Eliot AC, Kirsch JF. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:383-415.
- Engelen-Lee JY, Brouwer MC, Aronica E, van de Beek D. Pneumococcal meningitis: Clinical-pathological correlations (meningene-path). *Acta Neuropathol Commun.* 2016;4(1):016-0297.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998;4(11):1313-7.
- Fabry Z, Fitzsimmons KM, Herlein JA, Moninger TO, Dobbs MB, Hart MN. Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes. *J Neuroimmunol.* 1993;47(1):23-34.

- Fenech M. Folate, DNA damage and the aging brain. *Mech Ageing Dev.* 2010;131(4):236-41.
- Ferenz KB, Gast RE, Rose K, Finger IE, Hasche A, Krieglstein J. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor but not granulocyte colony-stimulating factor, nimodipine and dizocilpine, require ATP for neuroprotective activity after oxygen-glucose deprivation of primary neurons. *Brain Res.* 2012;11:20-6.
- Fillon S, Soulis K, Rajasekaran S, Benedict-Hamilton H, Radin JN, Orihuela CJ, El Kasmi KC, Murti G, Kaushal D, Gaber MW, Weber JR, Murray PJ, Tuomanen EI. Platelet-activating factor receptor and innate immunity: uptake of gram-positive bacterial cell wall into host cells and cell-specific pathophysiology. *J Immunol.* 2006;177(9):6182-91.
- Frankenburg FR. The role of one-carbon metabolism in schizophrenia and depression. *Harv Rev Psychiatry.* 2007;15(4):146-60.
- Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci.* 2006;79(3):281-6.
- Friso S, Girelli D, Martinelli N, Olivieri O, Lotto V, Bozzini C, Pizzolo F, Faccini G, Beltrame F, Corrocher R. Low plasma vitamin B-6 concentrations and modulation of coronary artery disease risk. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(6):992-8.
- Friso S, Jacques PF, Wilson PW, Rosenberg IH, Selhub J. Low circulating vitamin B(6) is associated with elevation of the inflammation marker C-reactive protein independently of plasma homocysteine levels. *Circulation.* 2001;103(23):2788-91.
- Ghielmetti M, Ren H, Leib SL, Tauber MG, Christen S. Impaired cortical energy metabolism but not major antioxidant defenses in experimental bacterial meningitis. *Brain Res.* 2003;976(2):139-48.
- Gianinazzi C, Grandgirard D, Imboden H, Egger L, Meli DN, Biffrare YD, Joss PC, Tauber MG, Borner C, Leib SL. Caspase-3 mediates hippocampal apoptosis in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol.* 2003;105(5):499-507.
- Gori AM, Sofi F, Corsi AM, Gazzini A, Sestini I, Lauretani F, Bandinelli S, Gensini GF, Ferrucci L, Abbate R. Predictors of vitamin B6 and folate concentrations in older persons: the InCHIANTI study. *Clin Chem.* 2006;52(7):1318-24.
- Grandgirard D, Schurch C, Cottagnoud P, Leib SL. Prevention of brain injury by the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin in experimental

- pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007a;51(6):2173-8.
- Grandgirard D, Steiner O, Tauber MG, Leib SL. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol.* 2007b;114(6):609-17.
- Grimwood K, Anderson P, Anderson V, Tan L, Nolan T. Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. *Arch Dis Child.* 2000;83(2):111-6.
- Guillemin GJ, Smythe G, Takikawa O, Brew BJ. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia.* 2005;49(1):15-23.
- Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *Faseb J.* 1987;1(5):358-64.
- 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.
- Han BH, D'Costa A, Back SA, Parsadanian M, Patel S, Shah AR, Gidday JM, Srinivasan A, Deshmukh M, Holtzman DM. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis.* 2000;7(1):38-53.
- Han BH, Holtzman DM. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci.* 2000;20(15):5775-81.
- Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1250:50-5.
- Harris RA, Amor S. Sweet and sour--oxidative and carbonyl stress in neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2011;10(1):82-107.
- Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(7).
- Hirst RA, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew PW. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clinical & Experimental Immunology.* 2004;138(2):195-201.
- 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.

- Iovino F, Molema G, Bijlsma JJ. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, a putative receptor for the adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to the vascular endothelium of the blood-brain barrier. *Infect Immun*. 2014;82(9):3555-66.
- Iovino F, Orihuela CJ, Moorlag HE, Molema G, Bijlsma JJ. Interactions between blood-borne *Streptococcus pneumoniae* and the blood-brain barrier preceding meningitis. *PLoS One*. 2013;8(7).
- Irazuzta J, Pretzlaff RK, Zingarelli B. Caspases inhibition decreases neurological sequelae in meningitis. *Crit Care Med*. 2008;36(5):1603-6.
- Iskandar BJ, Nelson A, Resnick D, Skene JH, Gao P, Johnson C, Cook TD, Hariharan N. Folic acid supplementation enhances repair of the adult central nervous system. *Ann Neurol*. 2004;56(2):221-7.
- Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 1998;393(6686):635-6.
- Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(4):288-301.
- Kalani A, Kamat PK, Givvimani S, Brown K, Metreveli N, Tyagi SC, Tyagi N. Nutri-epigenetics ameliorates blood-brain barrier damage and neurodegeneration in hyperhomocysteinemia: role of folic acid. *J Mol Neurosci*. 2014;52(2):202-15.
- Kannan K, Jain SK. Effect of vitamin B6 on oxygen radicals, mitochondrial membrane potential, and lipid peroxidation in H₂O₂-treated U937 monocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004;36(4):423-8.
- Kapczinski F, Frey BN, Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Cunha AB, Post RM. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. *Rev Bras Psiquiatr*. 2008;30(3):243-5.
- 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.
- Kastenbauer S, Koedel U, Pfister HW. Role of peroxynitrite as a mediator of pathophysiological alterations in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis*. 1999;180(4):1164-70.

- Kastenbauer S, Pfister HW. Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain*. 2003;126(Pt 5):1015-25.
- 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.
- Keles M, Al B, Gumustekin K, Demircan B, Ozbey I, Akyuz M, Yilmaz A, Demir E, Uyanik A, Ziypak T, Taysi S. Antioxidative status and lipid peroxidation in kidney tissue of rats fed with vitamin B(6)-deficient diet. *Ren Fail*. 2010;32(5):618-22.
- Kim KS. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(5):376-85.
- Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, Bhati M, Chen Z, Kostenko L, Reantragoon R, Williamson NA, Purcell AW, Dudek NL, McConville MJ, O'Hair RA, Khairallah GN, Godfrey DI, Fairlie DP, Rossjohn J, McCluskey J. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*. 2012;491(7426):717-23.
- Klein M, Koedel U, Pfister HW. Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy? *Prog Neurobiol*. 2006;80(6):269-80.
- Kodentsova VM, Vrzhesinskaia OA, Mazo VK. [Vitamins and oxidative stress]. *Vopr Pitan*. 2013;82(3):11-8.
- Koedel U, Frankenberg T, Kirschnek S, Obermaier B, Hacker H, Paul R, Hacker G. Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis. *PLoS Pathog*. 2009;5(5):29.
- Kostyukova NN, Volkova MO, Ivanova VV, Kvetnaya AS. A study of pathogenic factors of *Streptococcus pneumoniae* strains causing meningitis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1995;10(2):133-7.
- Kronenberg G, Colla M, Endres M. Folic acid, neurodegenerative and neuropsychiatric disease. *Curr Mol Med*. 2009;9(3):315-23.
- Kruman, II, Mouton PR, Emokpae R, Jr., Cutler RG, Mattson MP. Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. *Neuroreport*. 2005;16(10):1055-9.
- Lee K, Lee JS, Jang HJ, Kim SM, Chang MS, Park SH, Kim KS, Bae J, Park JW, Lee B, Choi HY, Jeong CH, Bu Y. Chlorogenic acid ameliorates brain damage and edema by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and 9 in a rat model of focal cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol*. 2012;689(1-3):89-95.

- 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*. 1996a;98(11):2632-9.
- Leib SL, Kim YS, Ferriero DM, Tauber MG. Neuroprotective effect of excitatory amino acid antagonist kynurenic acid in experimental bacterial meningitis. *J Infect Dis*. 1996b;173(1):166-71.
- 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, Studle N, Theurillat R, Grandgirard D, Thormann W, Leib SL. The mood-stabilizer lithium prevents hippocampal apoptosis and improves spatial memory in experimental meningitis. *PLoS One*. 2014;9(11).
- Lin Y, Dueker SR, Follett JR, Fadel JG, Arjomand A, Schneider PD, Miller JW, Green R, Buchholz BA, Vogel JS, Phair RD, Clifford AJ. Quantitation of in vivo human folate metabolism. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(3):680-91.
- Lindqvist D, Dhabhar FS, James SJ, Hough CM, Jain FA, Bersani FS, Reus VI, Verhoeven JE, Epel ES, Mahan L, Rosser R, Wolkowitz OM, Mellon SH. Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2016;76:197-205.
- Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, Arnelle DR, Stamler JS. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(11):5923-8.
- 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.
- Loeffler JM, Ringer R, Hablutzel M, Tauber MG, Leib SL. The free radical scavenger alpha-phenyl-tert-butyl nitron aggravates hippocampal apoptosis and learning deficits in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis*. 2001;183(2):247-52.
- Lu Y, Christian K, Lu B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem*. 2008;89(3):312-23.

- Lucas MJ, Brouwer MC, van de Beek D. Neurological sequelae of bacterial meningitis. *J Infect.* 2016;73(1):18-27.
- Lugo-Huitron R, Ugalde Muniz P, Pineda B, Pedraza-Chaverri J, Rios C, Perez-de la Cruz V. Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;104024(10):5.
- Macchiarulo A, Camaioni E, Nuti R, Pellicciari R. Highlights at the gate of tryptophan catabolism: a review on the mechanisms of activation and regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), a novel target in cancer disease. *Amino Acids.* 2009;37(2):219-29.
- Mahdi LK, Wang H, Van der Hoek MB, Paton JC, Ogunniyi AD. Identification of a novel pneumococcal vaccine antigen preferentially expressed during meningitis in mice. *The Journal of Clinical Investigation.* 122(6):2208-20.
- Mahfouz MM, Zhou SQ, Kummerow FA. Vitamin B6 compounds are capable of reducing the superoxide radical and lipid peroxide levels induced by H₂O₂ in vascular endothelial cells in culture. *Int J Vitam Nutr Res.* 2009;79(4):218-29.
- Marek L. The role of the apoptosome in the activation of procaspase-9. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2013;67(0):54-64.
- Marra A, Brigham D. *Streptococcus pneumoniae* causes experimental meningitis following intranasal and otitis media infections via a nonhematogenous route. *Infect Immun.* 2001;69(12):7318-25.
- Martin NG, Sadarangani M, Pollard AJ, Goldacre MJ. Hospital admission rates for meningitis and septicaemia caused by *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, and *Streptococcus pneumoniae* in children in England over five decades: a population-based observational study. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(5):397-405.
- Matte C, Pereira LO, Dos Santos TM, Mackedanz V, Cunha AA, Netto CA, Wyse AT. Acute homocysteine administration impairs memory consolidation on inhibitory avoidance task and decreases hippocampal brain-derived neurotrophic factor immunocontent: prevention by folic acid treatment. *Neuroscience.* 2009;163(4):1039-45.
- Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;005.
- Mayhan WG. Nitric oxide donor-induced increase in permeability of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2000;866(1-2):101-8.
- McCully KS. Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(5):1563S-8S.

- McCully KS. Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation. *Ann Clin Lab Sci.* 2009;39(3):219-32.
- McGill F, Heyderman RS, Panagiotou S, Tunkel AR, Solomon T. Acute bacterial meningitis in adults. *Lancet.* 2016;2(16):30654-7.
- McIntyre PB, O'Brien KL, Greenwood B, van de Beek D. Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide. *Lancet.* 2012;380(9854):1703-11.
- Meli DN, Christen S, Leib SL, Tauber MG. Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Opin Infect Dis.* 2002;15(3):253-7.
- Merkelbach S, Sittinger H, Schweizer I, Muller M. Cognitive outcome after bacterial meningitis. *Acta Neurol Scand.* 2000;102(2):118-23.
- Midttun Ø, Ulvik A, Ringdal Pedersen E, Ebbing M, Bleie Ø, Schartum-Hansen H, Nilsen RM, Nygård O, Ueland PM. Low Plasma Vitamin B-6 Status Affects Metabolism through the Kynurenine Pathway in Cardiovascular Patients with Systemic Inflammation. *The Journal of Nutrition.* 2011;141(4):611-7.
- Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(5):411-8.
- 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.
- Mitchell TJ. Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol.* 2000;151(6):413-9.
- 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.* 2013;123(1):17-23.
- Morris MS, Sakakeeny L, Jacques PF, Picciano MF, Selhub J. Vitamin B-6 Intake Is Inversely Related to, and the Requirement Is Affected by, Inflammation Status. *The Journal of Nutrition.* 2010;140(1):103-10.
- Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med.* 1999;189(9):1363-72.

- Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med*. 2008;40(3):180-96.
- Nagahara AH, Tuszynski MH. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(3):209-19.
- Okike IO, Ribeiro S, Ramsay ME, Heath PT, Sharland M, Ladhani SN. Trends in bacterial, mycobacterial, and fungal meningitis in England and Wales 2004-11: an observational study. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(4):301-7.
- Orihuela CJ, Mahdavi J, Thornton J, Mann B, Wooldridge KG, Abouseada N, Oldfield NJ, Self T, Ala, x, Aldeen DAA, Tuomanen EI. Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. *The Journal of Clinical Investigation*. 119(6):1638-46.
- Percudani R, Peracchi A. The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics*. 2009;10(1):273.
- Phillips RS. Structure and mechanism of kynureninase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2014;544(69-74).
- Pinto JT, Krasnikov BF, Alcutt S, Jones ME, Dorai T, Villar MT, Artigues A, Li J, Cooper AJL. Kynurenine Aminotransferase III and Glutamine Transaminase L Are Identical Enzymes that have Cysteine S-Conjugate β -Lyase Activity and Can Transaminate L-Selenomethionine. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(45):30950-61.
- Ploder M, Kurz K, Spittler A, Neurauter G, Roth E, Fuchs D. Early increase of plasma homocysteine in sepsis patients with poor outcome. *Mol Med*. 2010;16(11-12):498-504.
- Portnoy A, Jit M, Lauer J, Blommaert A, Ozawa S, Stack M, Murray J, Hutubessy R. Estimating costs of care for meningitis infections in low- and middle-income countries. *Vaccine*. 2015;7(33):061.
- 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.
- Radin JN, Orihuela CJ, Murti G, Guglielmo C, Murray PJ, Tuomanen EI. beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2005;73(12):7827-35.

- Rattiner LM, Davis M, Ressler KJ. Brain-derived neurotrophic factor in amygdala-dependent learning. *Neuroscientist*. 2005;11(4):323-33.
- Reis EA, Zugno AI, Franzon R, Tagliari B, Matte C, Lammers ML, Netto CA, Wyse AT. Pretreatment with vitamins E and C prevent the impairment of memory caused by homocysteine administration in rats. *Metab Brain Dis*. 2002;17(3):211-7.
- Richie MB, Josephson SA. A Practical Approach to Meningitis and Encephalitis. *Semin Neurol*. 2015;35(6):611-20.
- 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.
- Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal Disease. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(18):1378-88.
- Sachdev PS. Homocysteine and brain atrophy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29(7):1152-61.
- Savva A, Roger T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Front Immunol*. 2013;4(387):00387.
- Scheld WM, Koedel U, Nathan B, Pfister HW. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury. *J Infect Dis*. 2002;186 Suppl 2(S225-33).
- Sellner J, Tauber MG, Leib SL. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections. *Handb Clin Neurol*. 2010a;96(1-16).
- Sellner J, Täuber MG, Leib SL. Chapter 1 - Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections. In: KAREN, L. R. e ALLAN, R. T. (Ed.). *Handbook of Clinical Neurology*; 2010b. 1-16.
- Shen J, Lai C-Q, Mattei J, Ordovas JM, Tucker KL. Association of vitamin B-6 status with inflammation, oxidative stress, and chronic inflammatory conditions: the Boston Puerto Rican Health Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2010;91(2):337-42.
- Shimizu T, Nomiyama S, Hirata F, Hayaishi O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *J Biol Chem*. 1978;253(13):4700-6.
- Shin SH, Kim KS. Treatment of bacterial meningitis: an update. *Expert Opin Pharmacother*. 2012;13(15):2189-206.
- 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.

- Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child*. 1976;51(12):944-50.
- Solaroglu I, Cahill J, Jadhav V, Zhang JH. A novel neuroprotectant granulocyte-colony stimulating factor. *Stroke*. 2006;37(4):1123-8.
- Spinneker A, Sola R, Lemmen V, Castillo MJ, Pietrzik K, Gonzalez-Gross M. Vitamin B6 status, deficiency and its consequences--an overview. *Nutr Hosp*. 2007;22(1):7-24.
- Sridhar S, Greenwood B, Head C, Plotkin SA, Safadi MA, Saha S, Taha MK, Tomori O, Gessner BD. Global incidence of serogroup B invasive meningococcal disease: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(11):1334-46.
- Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier. *Curr Neuropharmacol*. 2008;6(3):179-92.
- Stephens RL, Jr., Uretsky NJ. Folate induced-hypermotility response after bilateral injection into the nucleus accumbens of the rat. Possible mediation through dopaminergic mechanisms. *Neuropharmacology*. 1986;25(8):887-96.
- Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis*. 2003;18(2):147-54.
- SVS. Situação da meningite pneumocócica no Brasil 2014; In: Saúde.
- Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett*. 2003;140-141:105-12.
- Tagliari B, Zamin LL, Salbego CG, Netto CA, Wyse AT. Hyperhomocysteinemia increases damage on brain slices exposed to in vitro model of oxygen and glucose deprivation: prevention by folic acid. *Int J Dev Neurosci*. 2006;24(4):285-91.
- Tavani A, Pelucchi C, Parpinel M, Negri E, La Vecchia C. Folate and vitamin B(6) intake and risk of acute myocardial infarction in Italy. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58(9):1266-72.
- Theofylaktopoulou D, Ulvik A, Midttun O, Ueland PM, Vollset SE, Nygard O, Hustad S, Tell GS, Eussen SJ. Vitamins B2 and B6 as determinants of kynurenines and related markers of interferon-gamma-mediated immune activation in the community-based Hordaland Health Study. *Br J Nutr*. 2014;112(7):1065-72.
- Tong L, Perez-Polo R. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protects cultured rat cerebellar granule neurons against glucose deprivation-induced apoptosis. *J Neural Transm*. 1998;105(8-9):905-14.

- Uchiyama S, Carlin AF, Khosravi A, Weiman S, Banerjee A, Quach D, Hightower G, Mitchell TJ, Doran KS, Nizet V. The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(9):1845-52.
- Ueland PM, McCann A, Midttun O, Ulvik A. Inflammation, vitamin B6 and related pathways. *Mol Aspects Med*. 2016;1(16):30039-5.
- Ulvik A, Midttun Ø, Ringdal Pedersen E, Nygård O, Ueland PM. Association of plasma B-6 vitamers with systemic markers of inflammation before and after pyridoxine treatment in patients with stable angina pectoris. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012;95(5):1072-8.
- 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. Progress and challenges in bacterial meningitis. *Lancet*. 2012;380(9854):1623-4.
- 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.
- van de Beek D, Schmand B, de Gans J, Weisfelt M, Vaessen H, Dankert J, Vermeulen M. Cognitive impairment in adults with good recovery after bacterial meningitis. *J Infect Dis*. 2002;186(7):1047-52.
- van de Kamp JL, Smolen A. Response of kynurenine pathway enzymes to pregnancy and dietary level of vitamin B-6. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995;51(4):753-8.
- Varon E. [Epidemiology of acute bacterial meningitis in adult patients in France]. *Med Mal Infect*. 2009;39(7-8):432-44.
- Verma S, Nakaoke R, Dohgu S, Banks WA. Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*. 2006;20(5):449-55.
- 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.
- Viviani B, Bartesaghi S, Corsini E, Villa P, Ghezzi P, Garau A, Galli CL, Marinovich M. Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem*. 2005;93(2):412-21.
- Weiss G, Murr C, Zoller H, Haun M, Widner B, Ludescher C, Fuchs D. Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1-

- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells. *Clin Exp Immunol.* 1999;116(3):435-40.
- White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL, Bush AI, Cappai R. Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J Neurochem.* 2001;76(5):1509-20.
- Williams LJ, Mai CT, Edmonds LD, Shaw GM, Kirby RS, Hobbs CA, Sever LE, Miller LA, Meaney FJ, Levitt M. Prevalence of spina bifida and anencephaly during the transition to mandatory folic acid fortification in the United States. *Teratology.* 2002;66(1):33-9.
- Williams LJ, Rasmussen SA, Flores A, Kirby RS, Edmonds LD. Decline in the prevalence of spina bifida and anencephaly by race/ethnicity: 1995-2002. *Pediatrics.* 2005;116(3):580-6.
- Wittwer M, Grandgirard D, Rohrbach J, Leib SL. Tracking the transcriptional host response from the acute to the regenerative phase of experimental pneumococcal meningitis. *BMC Infect Dis.* 2010;10(176):1471-2334.
- Wondrak GT, Jacobson EL. Vitamin B6: beyond coenzyme functions. *Subcell Biochem.* 2012;56:291-300.
- Yang LK, Wong KC, Wu MY, Liao SL, Kuo CS, Huang RF. Correlations between folate, B12, homocysteine levels, and radiological markers of neuropathology in elderly post-stroke patients. *J Am Coll Nutr.* 2007;26(3):272-8.
- Yang TT, Wang SJ. Pyridoxine inhibits depolarization-evoked glutamate release in nerve terminals from rat cerebral cortex: a possible neuroprotective mechanism? *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;331(1):244-54.
- Zhang C, Shen L. Folic acid in combination with adult neural stem cells for the treatment of spinal cord injury in rats. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(7):10471-80.
- Zhang JR, Mostov KE, Lamm ME, Nanno M, Shimida S, Ohwaki M, Tuomanen E. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell.* 2000;102(6):827-37.
- Zhang X, Huang G, Liu H, Chang H, Wilson JX. Folic acid enhances Notch signaling, hippocampal neurogenesis, and cognitive function in a rat model of cerebral ischemia. *Nutr Neurosci.* 2012;15(2):55-61.

- Zhang XH, Ma J, Smith-Warner SA, Lee JE, Giovannucci E. Vitamin B6 and colorectal cancer: current evidence and future directions. *World J Gastroenterol.* 2013;19(7):1005-10.
- Zhao Y, Huang G, Chen S, Gou Y, Dong Z, Zhang X. Folic acid deficiency increases brain cell injury via autophagy enhancement after focal cerebral ischemia. *J Nutr Biochem.* 2016;38:41-9.
- Zieminska E, Lazarewicz JW. Excitotoxic neuronal injury in chronic homocysteine neurotoxicity studied in vitro: the role of NMDA and group I metabotropic glutamate receptors. *Acta Neurobiol Exp.* 2006;66(4):301-9.
- Zingarelli B. Nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med.* 2005;33(12 Suppl):S414-6.
- Zou J, Crews F. CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26(4-6):385-405.
- Zugno AI, Canever L, Heylmann AS, Wessler PG, Steckert A, Mastella GA, de Oliveira MB, Damazio LS, Pacheco FD, Calixto OP, Pereira FP, Macan TP, Pedro TH, Schuck PF, Quevedo J, Budni J. Effect of folic acid on oxidative stress and behavioral changes in the animal model of schizophrenia induced by ketamine. *J Psychiatr Res.* 2016;81:23-35.
- Zwijnenburg PJG, Van Der Poll T, Roord JJ, Van Furth AM. Chemotactic factors in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis. *Infection and Immunity.* 2006;74(3):1445-51.
- Zysk G, Schneider-Wald BK, Hwang JH, Bejo L, Kim KS, Mitchell TJ, Hakenbeck R, Heinz HP. Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2001;69(2):845-52.
- Zysset-Burri DC, Bellac CL, Leib SL, Wittwer M. Vitamin B6 reduces hippocampal apoptosis in experimental pneumococcal meningitis. *BMC Infect Dis.* 2013;13(393):1471-2334.

ANEXOS



Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou a Aula Prática abaixo.

Protocolo: 022/2013

Professor Responsável: Tatiana Barichello

Equipe: Allan Collodel, Ana Paula Moreira, Ana Paula Panatto, Caroline Silva da Costa, Cintia Silvestre, Cleonice Michelin, Jaqueline da Silva Generoso, Lutiana Roque Simões, Mirelle Micheletto Carradore, Michael Hikaru, Renan Antônio Ceretta, Samuel Galvão Elias e Josiane Budni.

Título: “Efeitos da terapia adjuvante com ácido fólico e cianocobalamina sobre a resposta inflamatória e o estresse oxidativo durante a meningite pneumocócica experimental.”

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada a CEUA. Foi autorizada a utilização no total de 192 Ratos Wistar 250 – 300 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesec.net.

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 022/2013

Principal Investigator: Tatiana Barichello

Researchers: Allan Collodel, Ana Paula Moreira, Ana Paula Panatto, Caroline Silva da Costa, Cintia Silvestre, Cleonice Michelin, Jaqueline da Silva Generoso, Lutiana Roque Simões, Mirelle Micheletto Carradore, Michael Hikaru, Renan Antônio Ceretta, Samuel Galvão Elias e Josiane Budni.

Project title: “Effects of adjuvant therapy with folic acid and cyanocobalamin on the inflammatory response and oxidative stress during experimental pneumococcal meningitis.”

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

Criciúma, 02 de abril de 2013.

Patricia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA



Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 121/2012

Professor Responsável: Tatiana Barichello.

Equipe: Allan Collodel, Ana Paula Moreira, Ana Paula Panatto, Caroline Silva da Costa, Cintia Silvestre, Cleonice Michelon, Daiele Bendo Pagnan, Jaqueline da Silva Generoso, Lutiana Roque Simões, Mirelle Micheletto Carradore, Michael Hikaru, Renan Antônio Ceretta e Samuel Galvão Elias.

Título: "Efeitos da terapia adjuvante com vitamina B6 sobre a resposta inflamatória e o estresse oxidativo durante a meningite pneumocócica experimental.

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização no total de 104 ratos Wistar 60 dias 250-300 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesec.net.

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 121/2012

Principal Investigator: Tatiana Barichello.

Researchers: Allan Collodel, Ana Paula Moreira, Ana Paula Panatto, Caroline Silva da Costa, Cintia Silvestre, Cleonice Michelon, Daiele Bendo Pagnan, Jaqueline da Silva Generoso, Lutiana Roque Simões, Mirelle Micheletto Carradore, Michael Hikaru, Renan Antônio Ceretta e Samuel Galvão Elias.

Project title: "Effects of adjuvant therapy with vitamin B6 on the inflammatory response and oxidative stress in experimental pneumococcal meningitis".

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

Criciúma, 06 de novembro de 2012.

Patricia Fernanda Schuck
Patricia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA