

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ANA PAULA MOREIRA

**PAPEL DA VIA β -AMILÓIDE-RAGE NA DISFUNÇÃO
COGNITIVA TARDIA NA MENINGITE BACTERIANA**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana
Barichello
Coorientador: Prof. Dr. Felipe Dal
Pizzol

CRICIÚMA, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M835p Moreira, Ana Paula.

Papel da via β -Amilóide-Rage na disfunção cognitiva tardia na meningite bacteriana / Ana Paula Moreira ; orientadora : Tatiana Barichello, coorientador: Felipe Dal Pizzol. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2017.
80 p. : il. ; 21 cm.

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



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.


Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

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

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

ATA DE Mestrado em Ciências da Saúde – Nº 272

Com início às 15h00 (quinze horas) do dia quinze do mês de fevereiro de 2017 (dois mil e dezessete), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Ana Paula Moreira**, sob a orientação da Prof.^a Dra. Tatiana Barichello, intitulada **"PAPEL DA VIA β -AMILÓIDE-RAGE NA DISFUNÇÃO COGNITIVA TARDIA NA MENINGITE BACTERIANA"**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof.^a Dra. Fabrícia Petronilho (Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 16h00 (dezesseis horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.^a Dra. Josiane Budni Coordenadora Adjunta do Programa. Criciúma, 15 (quinze) de fevereiro de 2017 (dois mil e dezessete).


Prof.^a Dra. Josiane Budni
Coordenadora Adjunta do PPGCS


Diana Ghisi Daniel
Secretária

Folha informativa

A dissertação de mestrado 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 da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

A minha mãe!

AGRADECIMENTOS

Um trabalho, nunca é feito por uma pessoa apenas, ele é realizado em grupo, e desse grupo, criam-se elos, elos do qual surgem grandes e verdadeiras amizades; não é difícil nomear as pessoas que desse trabalho fizeram parte, pois cada uma foi de extrema importância para cada uma das numerosas etapas até a conclusão deste, e espero não esquecer ninguém.

Antes de qualquer coisa, tenho que agradecer a Deus, a força e alicerce de minha vida.

A minha mãe Ilza, que desde o primeiro dia de aula da minha vida, esteve ao meu lado me apoiando, dando força e nunca deixando que eu desistisse de meus sonhos; as barreiras superadas foram árduas, contudo nunca desistimos, enquanto ninguém mais apostava que fosse dar certo, a gente mostrou que era capaz. Mãe meus mais sinceros muito obrigada por tudo.

Ao meu irmão Ariel, que mesmo sendo meu irmão mais novo, sempre me deu muita força pra ir em frente. Ao meu irmão Álvaro, que sempre deixou claro que me admirava pelo esforço que eu estava fazendo ao dar continuidade ao curso e que mesmo de longe, me dava muita força, mesmo quando pra ele as coisas não estavam boas, o sorriso no rosto a frase “é isso aí minha irmã, não desiste, mostra que tu capaz” nunca saíram do repertório dele. Meu irmão, você é 1.000.000.

A minha orientadora, Dra. Tatiana Barichello, que sempre esteve presente no desenvolvimento desse trabalho e toda a minha jornada acadêmica. Muito obrigada por ter acreditado e aceitado fazer parte dessa fase da minha vida.

Ao meu coorientador, Dr. Felipe Dal-Pizzol, sempre bastante solícito a me atender, mesmo com toda a sua correria. Muito obrigada por estar presente.

A toda a equipe do Laboratório de Microbiologia Experimental, Jaque, Jessica, Drielly Cris, Cassia, Allan, Luti, Joana, Paulo, Gustavo, Jhonata, sem vocês, nada seria possível. A equipe do Laboratório de Neurociências, em especial as professoras Josi e Kuka, que estavam sempre disponíveis para me esclarecer alguma dúvida, ou então, só conversar mesmo.

A todos os professores, desde a tia Lurdes, minha primeira professora, até meus professores do ensino médio, magistério, do curso de graduação e do programa de pós-graduação, todos vocês fazem parte do que sou hoje, e trago um pedacinho de cada personalidade comigo.

Aos meus amigos e colegas, que me acompanham desde o início de tudo, sem o apoio e brincadeiras de vocês não teria sido a mesma coisa, não seria tão gratificante e completo, obrigada Gustavo Dal Pont pelas inúmeras brincadeiras, brigas e birras, que nos acompanham desde a graduação, obrigada Guilherme Raupp, pela bela amizade que foi estabelecida em tão pouco tempo e que pretendemos levar por muito tempo; Naithan Costa , todo seu jeito excêntrico me fez ver muitas coisas de outra forma, obrigada por tudo criaturinha que mora no meu coração e com quem eu brigo tanto. A Alexandra Heylmann, que durante todo tempo que tivemos juntas, foi a pessoa que mais me fazia rir e me orientava com seus concelhos. A Lucilene Possamai, que além de amiga, é uma irmã, a pessoa que mais me conhece, que esta sempre disposta a entrar em qualquer situação comigo, que me ama, me coloca os piores apelidos, mas é a primeira a entrar numa briga por mim. Ao Mateus Fortunato, um irmãozinho que a vida me deu e que eu tanto amo e admiro.

E a todos que estiveram presente em minha vida nesses últimos anos.

A todos, muito obrigado!

Nem sempre o produto final é o mais importante. Por vezes a riqueza se esconde é no processo das descobertas. O resultado é quase nada perto das oportunidades que o processo nos entrega.”

Padre Fábio de Melo

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

Resumo

A meningite ocasionada por *Klebsiella pneumoniae* tornou-se recentemente uma causa cada vez mais comum de infecção no sistema nervoso central, sendo esta caracterizada por uma intensa reação inflamatória. As doenças neurodegenerativas compartilham mecanismos comuns diretamente associados à agregação patológica de proteínas, como depósitos de fibras de amiloide em regiões vulneráveis do SNC, causando morte neuronal. O peptídeo β -amilóide induz a geração de EROs, prejudicando os sistemas antioxidantes celulares e é capaz de desencadear a ativação RAGE, o qual medeia uma série de eventos, incluindo a inflamação e dano oxidativo. A interação do receptor RAGE com seu ligante (β -amilóide, por exemplo) é capaz de estimular múltiplas vias de sinalização intracelular, incluindo a ativação e a translocação para o núcleo do fator de transcrição NF- κ B, que leva à produção de citocinas, quimiocinas, moléculas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e estresse oxidativo, causando inflamação. Este estudo traz a hipótese de que durante a meningite bacteriana ocorre a ativação do eixo β -amilóide-RAGE, causando assim, dano cognitivo a longo prazo e que o uso do inibidor de RAGE pode prevenir o dano cognitivo a longo prazo. Após a indução da meningite, os animais foram divididos em grupo sham e meningite, e foram eutanasiados em 1, 3 e 10 dias para avaliar o peptídeo β -amilóide, a expressão de RAGE e os níveis de HMGB-1 nas estruturas cerebrais. Os animais pertencentes ao grupo 10 dias, receberam antibioticoterapia, foram divididos em 3 grupos experimentais, sham, meningite e meningite+Ac-RAGE, e foram submetidos aos testes comportamentais. Em 1 dia após a indução, não foi encontrado diferença na expressão de β -amilóide, RAGE e níveis de HMGB1. Em 3 dias, foi observado um aumento na expressão de RAGE no hipocampo e córtex pré-frontal no grupo meningite. Em 10 dias, foi observado que a expressão de β -amilóide, RAGE e níveis de HMGB1 estavam aumentados em todas as estruturas do grupo meningite em comparação ao grupo sham, e que nos animais que receberam o tratamento com Ac-RAGE, esses estavam diminuídos ao comparar com o grupo meningite. Nos testes comportamentais os animais do grupo meningite demonstraram dano a memória de habituação e reconhecimento, estretanto, os animais pertencentes ao grupo que recebeu tratamento com Ac-RAGE, não apresentaram danos a essas memórias. Neste estudo, demonstrou-se que a infecção por K.

pneumoniae desencadeia a ativação do eixo β -amilóide-RAGE, aumentando os níveis de β -amilóide, RAGE e HMGB1, causando assim, dano cognitivo a longo prazo. Contudo, mais estudos precisam ser realizados para elucidar melhor cada fase dessa ativação e compreender melhor o papel da via β -amilóide-RAGE em doenças infecciosas, bem como o papel das doenças infecciosas nas doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Meningite, *Klebsiella pneumoniae*; doença de Alzheimer, β -amilóide; RAGE; HMGB-1.

Abstract

Meningitis by *Klebsiella pneumoniae* has recently become an increasingly common cause of infection in the central nervous system, characterized by an intense inflammatory reaction. Neurodegenerative diseases share common mechanisms directly associated with pathological aggregation of proteins, such as deposits of amyloid fibers in vulnerable regions of the CNS, causing neuronal death. The β -amyloid peptide induces the generation of ROS, damaging cellular antioxidant systems and is capable of triggering RAGE activation, which mediates a number of events, including inflammation and oxidative damage. The interaction of the RAGE receptor with its β -amyloid ligand, for example, is capable of stimulating multiple pathways of intracellular signaling, including activation and translocation to the nucleus of the NF- κ B transcription factor, which leads to the production of cytokines, Chemokines, proinflammatory molecules, adhesion molecules and oxidative stress, causing inflammation. This study hypothesizes that activation of the β -amyloid-RAGE axis occurs during bacterial meningitis, thus causing long-term cognitive impairment and that the use of the RAGE inhibitor may prevent long-term cognitive impairment. After induction of meningitis, the animals were divided into sham and meningitis groups, and euthanized at 1, 3 and 10 days to evaluate β -amyloid peptide, RAGE expression and HMGB-1 levels in brain structures. The animals belonging to the 10 day group received antibiotic therapy, divided into 3 experimental groups, sham, meningitis and meningitis + Ac-RAGE, and were submitted to behavioral tests. At 1 day post-induction, no difference was found in β -amyloid expression, RAGE and HMGB1 levels. At 3 days, an increase in RAGE expression was observed in the hippocampus and prefrontal cortex in the meningitis group. At 10 days, β -amyloid, RAGE and HMGB1 levels were found to be elevated in all meningitis structures compared to the sham group, and that in animals receiving Ac-RAGE treatment, these were decreased. When comparing with the meningitis group. In the behavioral tests, the animals of the meningitis group showed damage to the memory of habituation and recognition, however, the animals belonging to the group that received treatment with Ac-RAGE did not present damage to these memories. In this study, *K. pneumoniae* infection was shown to trigger activation of the β -amyloid-RAGE axis, increasing β -amyloid, RAGE and HMGB1 levels, thus causing long-term cognitive impairment. However, more

studies need to be done to better elucidate each phase of this activation and to better understand the role of the β -amyloid-RAGE pathway in infectious diseases, as well as the role of infectious diseases in neurodegenerative diseases.

Key words: Meningitis, *Klebsiella pneumoniae*; Alzheimer's disease, β -amyloid; RAGE; HMGB-1.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac-RAGE: Anticorpo RAGE

AGES: Produtos de Glicação Avançada (do inglês, *Advanced Glycation end Products*)

APP: Proteína Percussora Amilóide (do inglês, *Amyloid Precursor Protein*)

APP-CTF: Fragmento C- Terminal na Proteína Percussora Amilóide (do Inglês, *C-Terminal Fragment Percussive Protein Amyloid*)

BACE1: Enzima de Clivagem de Proteína Percussora Amilóide 1 (do inglês, *β -site APP-cleaving enzyme*)

BHE: Barreira Hematoencefálica

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX2: Ciclooxygenase 2

Cu: Cobre

DAMP: Padrões Moleculares Associados ao Dano (do inglês, *Damage-Associated Molecular Pattern*)

DP: Desvio Padrão

EPM: Erro Padrão da Média

ERK: Quinases Reguladas por Sinal Extracelular (do inglês, *Extracellular Signal-Regulated Kinase*)

ERN: Espécies Reativas ao Nitrogênio

EROs: Espécies Reativas ao Oxigênio

Fe: Ferro

GSK3: Glicogênio Sintase Quinase-3 (do inglês, *Glycogen Synthase Kinase-3*)

HMGB1: Proteína do Grupo 1 de Alta Mobilidade (do inglês, *High-Mobility Group Box-1*)

IL: Interleucina

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzível (do inglês, *Induced Nitric Oxide Sintase*)

JNK: JUN N-Terminal Kinase

K. pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*

LCR: Líquido Cefalorraquidiano (líquor)

LCRa: Líquido Cefalorraquidiano Artificial

MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinase*)

mRNA: Ácido Ribonucleico Mensageiro (do inglês, *Messenger Ribonucleic Acid*)
NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NF- κ B: Fator Nuclear kappa B (do inglês, Nuclear factor Kappa B)
NFTA1: Fator Nuclear de Células T1 Ativadas (do inglês, *Nuclear Factor of Activated T-Cells 1*)
PAMP: Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)
Pgp: Glicoproteína P
PRRS: Receptores específicos de reconhecimento padrão (do inglês, *Patern recognition receptors specific*)
RAGE: Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada (do inglês *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*)
TLR4: Receptor Toll-like-4 (do inglês, *Toll-like Receptor 4*)
S100 β : Subunidade Beta da Proteína Ligante de Cálcio
sAPP α : Proteína Percussora Amilóide Alfa Solúvel (do inglês, *Soluble Amyloid Precursor Protein Alpha*)
sAPP β : Proteína Percussora Amilóide Beta Solúvel (do inglês, *Soluble Amyloid Precursor Protein Beta*)
SNC: Sistema Nervoso Central
SPSS: Pacote Estatístico para Ciências Sociais (do inglês, *Statistical Package for Social Sciences*)
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês, *Tumor Necrosis Factor Alpha*)
UNESC: Universidade do Extremo Sul Catarinense
 α -secretase: Alfa Secretase
 β -amilóide: Beta Amilóide
 β -secretase: Beta Secretase
 γ -secretase: Gama Secretase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fisiopatologia da meningite bacteriana	35
Figura 2: O estress oxidativo medeia a ativação de BACE1 induzida por β -amiloide.	39
Figura 3: Representação do desenho experimental	44
Figura 4: Teste de habituação ao campo aberto	45
Figura 5: Teste de memória de reconhecimento de objetos	46
Figura 6: Expressão do receptor RAGE no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar em 1, 3 e 10 dias após a indução da meningite por <i>K. pneumoniae</i>	49
Figura 7: Deposição de β -amilóide no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar em 1, 3 e 10 dias após a indução da meningite por <i>K. pneumoniae</i>	51
Figura 8: Níveis de HMGB1 no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar em 1, 3 e 10 dias após a indução da meningite por <i>K. pneumoniae</i>	53
Figura 9: Teste de habituação ao campo aberto 10 dias após a indução de meningite pela <i>K. pneumoniae</i> 5).	54
Figura 10: Teste de reconhecimento de objetos 10 dias após a indução da meningite por <i>K. pneumoniae</i>	54

Sumário

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 MENINGITE.....	31
1.2 FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE BACTERIANA	32
1.3 SISTEMA NERVOSO CENTRAL E A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	36
1.4 PEPTÍDIO β -AMILÓIDE	37
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO NA FORMAÇÃO DO PEPTÍDIO β -AMILÓIDE	39
1.6 HIPÓTESE A SER TESTADA	40
2 OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 PREPARAÇÃO DO MICROORGANISMO INFECTANTE.....	42
3.2 MODELO ANIMAL E INOCULAÇÃO BACTERIANA	42
3.3 CIRURGIA DE CANULAÇÃO DOS ANIMAIS	43
3.4 DESENHO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	43
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS	44
3.5.1 Habituação ao campo aberto	44
3.5.2 Memória de reconhecimento de objetos.....	45
3.6 TESTES BIOQUÍMICOS	46
3.6.1 Análise por Western blotting.....	46
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
4. RESULTADOS	48
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	59
REFÊRENCIAS	60
ANEXO	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 MENINGITE

A meningite bacteriana é uma infecção grave que acomete o sistema nervoso central (SNC), caracterizada por uma inflamação das meninges afetando a pia-mater, aracnoide e o espaço subaracnóide (Van De Beek et al., 2006), desencadeando danos neurológicos, tais como transtornos convulsivos, perda de audição, déficits sensório-motores e prejuízo de memória e aprendizagem (Koedel et al., 2002; Bellac et al., 2010).

Essa infecção é causada pelo agente infeccioso e, em parte, pela resposta inflamatória do hospedeiro (Roos et al., 2010) resultando no dano cerebral do hospedeiro (Bifrare et al., 2003). Essa resposta inflamatória desempenha um papel primordial na patogênese das lesões cerebrais associadas a diferentes etiologias da meningite (Van Furth et al., 1996; Tauber et al., 1999).

Estudos apontam que aproximadamente 1,2 milhões de casos de meningite e 135.000 mortes ocorrem anualmente em todo o mundo (Brandt, 2010; Thigpen et al., 2011). A mortalidade por meningite pneumocócica pode variar entre 15% em países industrializados e até 40% em países em desenvolvimento (Molyneux et al., 2002; Brandt, 2010; Fritz et al., 2012). Aproximadamente 50% dos sobreviventes apresentam graves distúrbios neurológicos e neuropsicológicos, sendo evidenciada associação com doenças psiquiátricas (Abraham et al., 2005). Na década de 1990, o Brasil possuía uma média de 28.000 casos de meningite, de diferentes etiologias (Epidemiologia, 2005).

Vários estudos epidemiológicos revelaram que a *Klebsiella pneumoniae* é o patógeno mais comumente implicado em infecções adquiridas na comunidade, especialmente em Tailândia, ocasionando a meningite bacteriana em adultos (Ko et al., 2002). Grande parte deste aumento no número de casos é relacionada com a frequência de procedimentos neurocirúrgicos, e o grande número de pacientes com lesão na cabeça devido a acidentes de motocicletas (Lu, Chang, Lin, et al., 2002), porém, doenças crônicas como diabetes e cirrose hepática predis põem a meningite (Lu, Chang e Chang, 2002).

Nos países ocidentais, a epidemiologia é diferente, a infecção por *K. pneumoniae* adquirida na comunidade é rara, entretanto, é predominantemente alta quando adquirida em hospitais, especialmente em casos de pós-neurocirurgias. A *K. pneumoniae* tornou-se recentemente a causa mais comum de meningite aguda (Lu, Chang e

Chang, 2002) sendo responsável por 14-61% da meningite nosocomial (Barichello et al., 2010), sendo particularmente devastadora entre pacientes imunocomprometidos (Sahly et al., 1997).

A *K. pneumoniae*, uma bactéria Gram-negativas, é o patógeno mais comumente encontrado em infecções adquiridas (Ko et al., 2002), sendo a causa mais comum de meningite, principalmente em pacientes com traumatismo craniano, intervenções neurocirúrgicas, e as defesas do hospedeiro prejudicada (Lu et al., 1999; Lu, Chang e Chang, 2002). Pacientes com meningite ocasionada por *K. pneumoniae* apresentam alta taxa de mortalidade 30 a 40% e sequelas neurológicas frequentes (Tang et al., 1999).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE BACTERIANA

O SNC difere-se, na resposta inflamatória, em relação a outros órgãos. A infiltração celular no cérebro em resposta à inflamação, à infecção e ao dano pode ser lenta e fraca, mas, muitas vezes, essa resposta pode ser induzida de forma vertiginosa. Esta mesma inclui a ativação da microglia, liberação de proteínas de fase aguda, complemento e citocinas (Allan et al., 2001). A proliferação de bactérias no interior do espaço subaracnóide estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Janeway, 2007). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a Interleucina 1 β (IL-1 β), a Interleucina 6 (IL-6) (Meli et al., 2006; Van De Beek, 2009) e a citocina quimiotática indutora de neutrófilos (CINC-1) (Baraff et al., 1993) têm mostrado contribuir para o aumento do dano cerebral da meningite bacteriana (Waage et al., 1989; Leib et al., 2000; Leppert et al., 2000).

O fator predisponente para o desenvolvimento da meningite bacteriana é a adesão e colonização da nasofaringe por um microrganismo (Koedel et al., 2002). O microrganismo coloniza a mucosa da superfície do trato respiratório superior, sendo a colonização desse sítio aparentemente assintomática (Ostergaard et al., 2010). Após a colonização da cavidade nasal, este patógeno atravessa a BHE, atravessando-a, sem evidência de dano ou detecção do microrganismo entre as células (Nelson et al., 2007; Kim, 2008).

Uma vez alcançado o SNC, a bactéria multiplica-se rapidamente, disseminando-se sobre toda a superfície do cérebro, o que leva a uma rápida lise bacteriana com liberação de substâncias indutoras de inflamação como peptidoglicano e fragmentos da parede celular que são altamente imunogênicos e podem conduzir a um aumento da resposta inflamatória do hospedeiro (Koedel et al., 2010; Sellner et al.,

2010), desencadeando uma grande liberação de moléculas pró-inflamatórias. Estes, por sua vez, aumentam a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e atraem leucócitos para o SNC (pleocitose)..

O reconhecimento do patógeno ocorre por meio das interações de seus produtos com receptores de reconhecimento padrão (PRR), sobre os quais numerosas citocinas e quimiocinas são liberados a partir de células da imunidade inata para realizar ações imunológicas que visam a proteção (Koedel et al., 2002). O padrão de mediadores inflamatórios presentes no líquido cefalorraquidiano (LCR) em resposta ao ataque imunológico determina a gravidade da doença e suas sequelas (Azuma et al., 1997; Brandt et al., 2006).

Os danos causados pela meningite afetam múltiplas áreas do cérebro com uma distribuição heterogênea afetando-as em diferentes tempos (Kim et al., 1995) gerando uma resposta imune exacerbada lesionando o tecido neuronal e causando prejuízos neuropsicológicos e cognitivos, através de uma reação apoptótica (Leib et al., 1996; Koedel et al., 1999; Nau et al., 1999; Irazuzta et al., 2005; Chen et al., 2009).

As doenças neurodegenerativas compartilham mecanismos comuns diretamente associados à agregação patológica de proteínas, como depósitos de fibras de amiloide em regiões vulneráveis do SNC (Tillement et al., 2010). Na Doença de Alzheimer, as proteínas tau fosforiladas anormalmente formam os emaranhados neurofibrilares e o peptídeo β -amilóide acumula-se no meio extracelular e forma placas amilóides, causando morte neuronal (Haapasalo et al., 2010).

A deposição excessiva de β -amilóide no tecido cerebral ativa o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e induz a secreção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a ciclooxigenase 2 (COX-2) pela microglia (Kang et al., 2001; Martin-Moreno et al., 2011). O peptídeo β -amilóide também é capaz de desencadear a ativação do receptor para produtos de glicação avançada (RAGE), o qual medeia uma série de eventos, incluindo a inflamação e dano oxidativo (Fang et al., 2010; Carrano et al., 2011).

O RAGE é uma proteína transmembrana que reconhece moléculas tridimensionais, promovendo interação com diversos ligantes (Deane et al., 2012). Adicionalmente, o RAGE representa um fator importante na imunidade inata contra agentes patogênicos, mas também interage com ligantes endógenos, resultando na inflamação crônica (Fang et al., 2010; Zong et al., 2010). Além de produtos da glicação avançada (AGEs), o RAGE tem outros ligantes importantes, tais como

proteína do grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1), subunidade α da proteína ligante de cálcio S100 (S100 β), peptídeos β -amilóide, entre outros (Takuma et al., 2009; Carrano et al., 2011).

A interação do receptor RAGE com seu ligante (β -amilóide, por exemplo) é capaz de estimular múltiplas vias de sinalização intracelular, incluindo a ativação e a translocação para o núcleo do fator de transcrição NF- κ B, que leva à produção de citocinas, quimiocinas, moléculas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e estresse oxidativo, causando inflamação (Fang et al., 2010; Deane et al., 2012). Além disso, verificou-se sua relação com uma variedade de lesões no SNC, como disfunção neuronal, amplificação da neuroinflamação e aumento do influxo de β -amilóide pela BHE (Takuma et al., 2009; Fang et al., 2010; Carrano et al., 2011; Deane et al., 2012).

A ativação de RAGE por seu ligante, através da ativação dos receptores acoplados a proteína G, é capaz de gerar um feedback positivo entre RAGE e NF- κ B, gerando um sucessão ininterrupta entre estresse oxidativo e inflamação, que cursaria com aumento de β -amilóide e consequente ativação de NF- κ B, e então, aumento da expressão de RAGE (Metz et al., 2012). A interação dos diversos ligantes com o RAGE dá-se em seu domínio extracelular V mediante a oligomerização do receptor (Xie et al., 2008) Por sua vez, o RAGE aumentado interage com seus ligantes, induzindo a geração de espécies reativas ao oxigênio (ERO) e ativa NF- κ B novamente (Carrano et al., 2011; Metz et al., 2012; Zhang et al., 2013) (Figura 1). Isso dá-se ao fato de que, ao se ligarem ao RAGE, os AGE promovem a produção de EROs na via nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidada, fosforilação, quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), JUN N-terminal Kinase (JNK), p38, p48 (via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)) com consequente ativação do NF- κ B (Tanaka et al., 2000) Adicionalmente, a ativação de RAGE pode ser feita por HMGB1, que está aumentado nos fluidos extracelulares em doenças inflamatórias, bem como por S100 β , uma proteína relevante na disfunção do SNC (Sims et al., 2010).

Dados da literatura indicam que uma diminuição na atividade de α -secretase e um aumento na atividade de β e γ -secretase podem induzir a deposição cerebral de β -amilóide (Gonzalez-Burgos et al., 2011; Waites et al., 2011). Outro fator importante é que a toxicidade de β -amilóide parece ser dependente do estado metabólico do organismo, visto que ocorre uma disfunção mitocondrial em doenças infecciosas (Wuwongse et al., 2013).

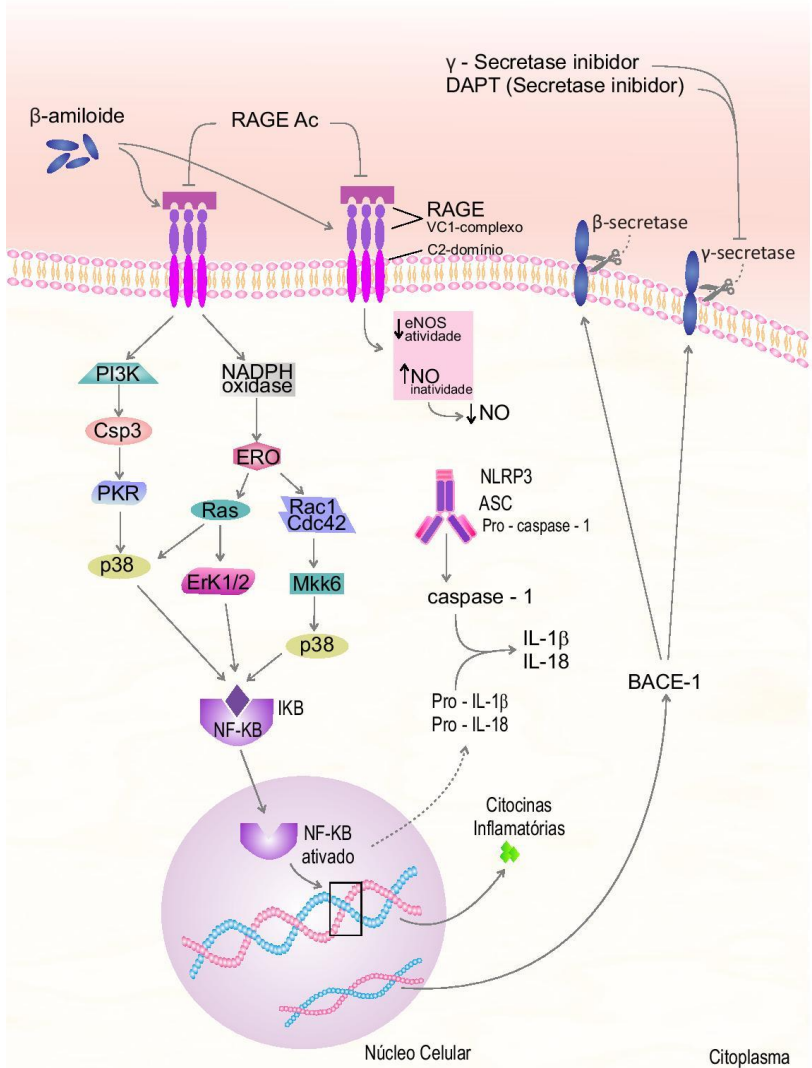


Figura 1: Fisiopatologia da meningite bacteriana. Ativação do RAGE receptor através de padrões moleculares associados ao dano (DAMP) e padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e a produção de β -amiloide na fisiopatologia da meningite bacteriana.

Estratégias terapêuticas recentes sugerem que RAGE é um importante alvo para o tratamento de doenças inflamatórias, visto que a

inflamação aumenta a síntese de β -amilóide e regula positivamente RAGE, e a ativação dessa via induz disfunção cognitiva a longo prazo por apoptose neuronal. Além disso, a toxicidade de β -amilóide induz ainda mais disfunção mitocondrial nesse processo (Gong et al., 2010; Han et al., 2011).

1.3 SISTEMA NERVOSO CENTRAL E A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

O SNC tem características anatômicas e imunológicas que desempenham um papel importante na patogênese e na detecção da infecção (Agyeman, 2014). Infecções por patógenos no SNC tornam-se potencialmente fatal e com altas taxas de mortalidade, particularmente a meningite bacteriana (Sellner et al., 2010).

A BHE é afetada por doenças neurológicas, e por sua vez, modula o processo da doença (Weiss et al., 2009; Pan et al., 2011). O SNC é protegido contra a invasão bacteriana pelo crânio ósseo, pelas leptomeninges e pela BHE; esta é formada por células endoteliais microvasculares, astrócitos e perícitos, que desempenham um papel no controle da troca de substâncias para dentro e fora do cérebro, protegendo o mesmo contra toxinas e patógenos (Kim, 2008; Sellner et al., 2010).

Juntamente com a BHE, existe a barreira hemato liquorica, que inibe a livre difusão de moléculas do sangue para o SNC (Engelhardt, 2006; Sellner et al., 2010). Essa mesma consiste em uma alta densidade de capilares, separada do espaço subaracnóide pela pia mater e células endimárias coróides (Engelhardt, 2006).

O aumento da BHE permite que circulem pelo SNC substâncias tóxicas para o parênquima cerebral, com infiltração de leucócitos e ativação da microglia, promovendo uma resposta inflamatória (Cardoso et al., 2010). Existem muitos mecanismos envolvidos nesse rompimento da BHE, incluindo dano as junções apertadas, degradação da lâmina de matriz, alterações na pinocitose, entre outras, podendo ter como consequência, o fornecimento inadequado de nutrientes (Seo et al., 2012; Erickson et al., 2013)

A ruptura da BHE inclui (1) o extravasamento de substâncias circundantes no SNC, podendo essas serem neurotóxicas; (2) disfunção do transportador p, que tem como consequência o fornecimento inadequado de nutrientes, o acúmulo de substâncias tóxicas e o aumento da entrada de compostos que são, normalmente, excluídos; e (Abbott,

2002); e a expressão e excreção de proteínas alteradas por células endoteliais, que podem resultar em ativação inflamatória, estresse oxidativo e danos neuronais (Armulik et al., 2010; Erickson e Banks, 2013).

Estudos em torno do envolvimento do β -amilóide na ruptura da BHE têm sido realizados a cerca de 30 anos, e alguns autores tem mostrado que os fatores de ruptura da BHE, citados acima, estão presentes na doença de Alzheimer, sugerindo assim sua ruptura durante a doença (Gherzi-Egea et al., 1996). Outro ponto a ser justificado para correlacionar a ruptura da BHE e a doença de Alzheimer é o fato de que a Albumina no SNC é derivada a partir de fontes periféricas; portanto, uma quantidade aumentada da mesma no SNC pode ser usada como um indicativo da ruptura da BHE (Tibbling et al., 1977). Allafuzoff et al (1983), mostrou que os níveis de Albumina no SNC são elevados em pacientes com doença de Alzheimer (Alafuzoff et al., 1983).

Mais recentemente, evidenciou-se que transportadores, como a glicoproteína P transportadora (Pgp) de múltiplos fármacos facilitam a entrada de β -amilóide, quebrando a BHE (Donahue et al., 2006). Matsubara et al (1990) sugere ainda que, a BHE ainda regula a entrada de β -amilóide no plasma para o SNC através do RAGE (Matsubara et al., 1999). Relatos de estudos com modelos experimentais de doença de Alzheimer e em pacientes pós-mortem apresentaram níveis elevados de β -amilóide no plasma (Shibata et al., 2000; Kagan et al., 2002). Contudo, todas essas evidências referentes ao comprometimento da permeabilidade da BHE e a entrada de β -amilóide no SNC ainda vem sendo estudadas em modelos experimentais (Erickson e Banks, 2013).

1.4 PEPTÍDIO β -AMILÓIDE

O peptídeo β -amilóide é derivado da clivagem altamente regulada e sequencial de proteína precursora amilóide (APP), uma proteína transmembranar, na qual existem três isoformas principais, denominadas APP695, APP751 e APP770, que são produzidas através do splicing alternativo de um mRNA simples e amplamente expressos no cérebro, conhecida γ -secretases e enzima de clivagem de proteína precursora de amilóide 1 (BACE 1) (Tanaka et al., 1988; Mehta et al., 2001; Laferla et al., 2007).

Para que a APP seja processado totalmente em β -amilóide, são necessárias enzimas secretases, que são produtos secretados para o espaço extracelular ou que permanecem associados a células, podendo

ser clivado pelas enzimas α , β ou γ secretase (Zhang et al., 2011; Wilkins et al., 2016). A APP por si, não é neurotóxico e não produz β -amilóide até que sofra clivagem proteolítica (Koo et al., 1990). Nos seres humanos, o gene APP está localizado no cromossomo 21 (Matsui et al., 2007; Hollands et al., 2016), sendo produzido em quantidades consideráveis em neurônios, onde é classificado no complexo de Golgi e, em seguida, enviado para os axônios (Koo et al., 1990).

A APP é, primeiramente clivado pela BACE1 (Burton et al., 2008), liberando um domínio chamado de proteína percussora amilóide beta solúvel (sAPP β) para formar um fragmento C- terminal na APP (APP-CTF), ou C99, que será adicionalmente clivado por γ -secretase dentro da membrana celular, libertando peptídeos β -amilóides neurotóxicos e domínio intracelular amilóide (Oe et al., 2006; Burton et al., 2008; Ford et al., 2008). A deposição do peptídeo β -amilóide e a formação de emaranhados neurofibrilares intracelulares são as características patológicas predominantes na doença de Alzheimer (Querfurth et al., 2010).

Uma vez liberado, o β -amilóide acumula-se e forma os primeiros oligômeros, então fibrilas e finalmente placas de proteína (Meyer-Luehmann et al., 2008). As placas de β -amilóide causam então, uma hiperfosforilação da proteína tau, associada à microtúbulos, fazendo com o β -amilóide se acumule e forme emaranhados neurofibrilares, que causam disfunção sináptica e contribuem consideravelmente nos sintomas da doença de Alzheimer (Bierer et al., 1995; Brion, 1998; Macleod et al., 2015).

O peptídeo β -amilóide induz a geração de ERO, com a possível contribuição de íons metálicos, o cobre (Cu) e o ferro (Fe), que estão presentes em depósitos amilóides (Huang, Atwood, et al., 1999; Huang, Cuajungco, et al., 1999). Por outro lado, o peptídeo β -amilóide contribui também para o estresse oxidativo ao prejudicar os sistemas antioxidantes celulares (Kim et al., 2003).

A clivagem de APP pela α -secretase produz β -amilóide, contudo, não o suficiente para que o mesmo seja tóxico ou conduza ao desenvolvimento da doença de Alzheimer (Johnson et al., 2010; Macleod et al., 2015), contudo, libera o domínio extracelular solúvel de APP alfa (sAPP α) em um processo chamado de derramamento de ectodomínio (Lammich et al., 1999). Presume-se que este tenha propriedade neuroprotetoras (Furukawa et al., 1996).

O fragmento C- terminal restante, ligado a membrana de APP, é então clivado pela γ -secretase, para então liberar um peptídeo p3

(Nathalie et al., 2008). A clivagem pelas β - e γ -secretases, produzem várias isoformas do peptídeo, que pode se agregar as placas senis (O'brien et al., 2009). A γ -secretase esta envolvida na clivagem da várias membranas transmembranares e sua clivagem são essenciais na maturação da APP (De Strooper et al., 1999; Takami et al., 2012).

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO NA FORMAÇÃO DO PEPTÍDIO β -AMILÓIDE

A BACE1 é uma protease capaz de clivar o APP em sAPP β e indutora de estresse oxidativo (Mercurio et al., 1999). O estresse oxidativo, a inflamação, o desequilíbrio da homeostase do cálcio, hipóxia, isquemia e as condições de traumatismo que ocorrem na doença de Alzheimer ativam a BACE1 (Buggia-Prevot et al., 2008; Tamagno et al., 2008), e sua desregulação poderia contribuir e possivelmente acelerar a patologia da doença de Alzheimer, aumentando a produção do peptídeo β -amilóide (Tamagno et al., 2006; Tamagno et al., 2008; Sadleir et al., 2012).

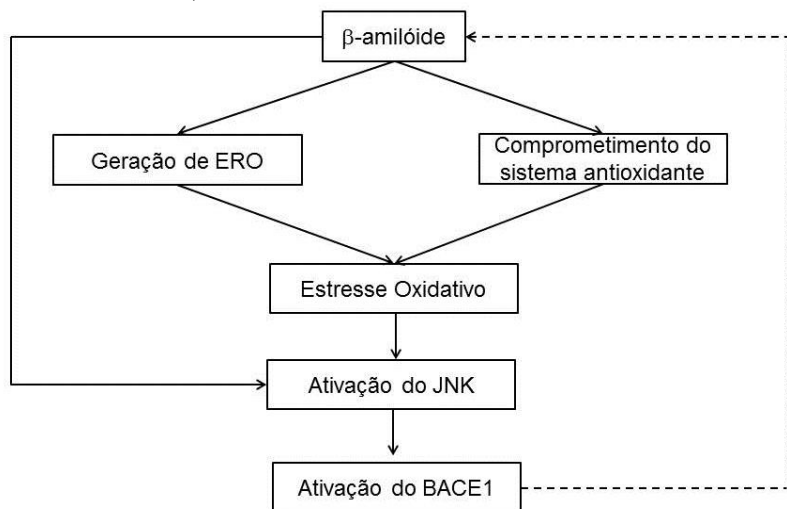


Figura 2: O estresse oxidativo medeia a ativação de BACE1 induzida por β -amilóide. Os peptídeos β -amilóide desencadeiam o estresse oxidativo induzindo a geração de EROs e prejudicando o sistema antioxidante. O estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias ativam JNK, então seu fator de transcrição ativa BACE1. Como BACE1 produz peptídeos β -amilóides, um ciclo vicioso é estabelecido. BACE1, Enzima de Clivagem de Proteína Percussora Amilóide 1; JNK, Jun N-terminal Kinase. Adaptado de Chami e Checler, 2012.

Tem sido relatado que os níveis de enzimas antioxidantes é diminuída, enquanto que a inflamação, a produção de EROs e os níveis dos marcadores de estresse oxidativo são elevados no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer (Sultana et al., 2010; Krstic et al., 2013). O estresse oxidativo regula o aumento da atividade da γ -secretase, levando assim a uma produção ainda maior de β -amiloide (Paola et al., 2000).

Conforme mencionado, o β -amiloide induz estresse oxidativo e este ativa BACE1, que indiretamente gera mais estresse oxidativo (Chami et al., 2012). Curiosamente, a peroxidação lipídica pode ser detectada antes mesmo da deposição de β -amiloide (Pratico et al., 2001). Por outro lado, o aumento do estresse oxidativo foi detectado nas proximidades de placas amilóides (McLellan et al., 2003; Garcia-Alloza et al., 2006; Xie et al., 2015) e o peptídeo β -amiloide mostrou por si só ser capaz de aumentar o estresse oxidativo (Butterfield, 2002; Butterfield et al., 2002; Atamna et al., 2006; Butterfield et al., 2006; Cai, Zhao e Ratka, 2011). No entanto, a causalidade e inter-relação entre os estresse oxidativo e a patologia do β -amiloide e a doença de Alzheimer ainda permanece mal compreendida (Chami e Checler, 2012).

1.6 HIPÓTESE A SER TESTADA

O estudo traz como hipótese que durante a meningite bacteriana ocorre a ativação do eixo β -amiloide-RAGE, causando assim, dano cognitivo a longo prazo e que o uso do inibidor de RAGE poderia prevenir o dano cognitivo a longo prazo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar se a ativação da via β -amilóide-RAGE é um componente importante na disfunção cognitiva a longo prazo em um modelo experimental de meningite pneumocócica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de β -amilóide, RAGE e HMGB1 no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos Wistar adultos em 1, 3 e 10 dias após a indução de meningite pelo *K. pneumoniae*.

- Avaliar os parâmetros comportamentais através da verificação da memória de habituação e reconhecimento em ratos Wistar adultos 10 dias após a indução de meningite pelo *K. pneumoniae* com e sem a inibição do RAGE.

- Avaliar os níveis de β -amilóide, RAGE e HMGB1 no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos Wistar adultos em 10 dias após a indução de meningite pelo *K. pneumoniae* com e sem a inibição do RAGE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Neurociências e de Microbiologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Este estudo foi realizado dentro das diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais (Protocolo 021/2015-2).

3.1 PREPARAÇÃO DO MICROORGANISMO INFECTANTE

K. pneumoniae foi cultivada durante a noite em 10 ml de caldo Todd Hewitt, diluídas em meio fresco e crescidas até à fase logarítmica. A cultura foi centrifugada durante 10 min a (5000 g) e novamente suspensas em solução salina estéril a uma concentração de 1×10^6 UFCol/ml. O tamanho do inóculo foi confirmada pela cultura quantitativa (Irazuzta, J. E. et al., 2002; Barichello, T., Savi, G. D., et al., 2010).

3.2 MODELO ANIMAL E INOCULAÇÃO BACTERIANA

Foram utilizados ratos adultos Wistar machos com (250-300 g), provenientes do biotério da universidade. Todos os procedimentos cirúrgicos e inoculações bacterianas foram realizados sob anestesia, composta de uma administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina (6,6 mg/kg), cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg) e acepromazina (0,16 mg/kg) (Grandgirard, Schurch, et al., 2007; Hoogman et al., 2007).

Os animais foram submetidos a uma punção na cisterna magna com uma agulha calibre 23, recebendo 10 µL de solução salina estéril como placebo ou volume equivalente de suspensão bacteriana de *K. pneumoniae*. No momento da inoculação, os animais receberam reposição volêmica e foram subsequentemente devolvidos às suas gaiolas (Irazuzta et al., 2002; Irazuzta et al., 2008). Concomitantemente, os animais receberam ceftriaxona (100 mg/kg) intraperitonealmente, a cada 12h, durante sete dias. Após 10 dias, os animais estarão livres de infecção.

Dezoito horas após a indução da meningite foi realizado a confirmação da infecção bacteriana, por uma cultura quantitativa de 5 µL de LCR obtido por punção da cisterna magna (Grandgirard, Bifrare,

et al., 2007; Grandgirard, Schurch, et al., 2007; Grandgirard et al., 2010).

3.3 CIRURGIA DE CANULAÇÃO DOS ANIMAIS

Seis dias após a indução, os animais foram submetidos a anestesia e colocados no aparelho estereotáxico; inicialmente foi removido a pele e o couro cabeludo dos ratos na região do crânio. Em seguida, inserido uma cânula de 1 mm, colocada mediante as seguintes coordenadas: anteroposterior - 2,2 mm, lateral +/- 2,0 mm, e ventral -3,7 mm da linha média; sendo a cânula assim implantada à 2.6 mm de profundidade no ventrículo lateral, a fim de atingir o hipocampo. A fixação da cânula foi feita com cimento acrílico. Os animais receberam, ou o líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa) (10 μ g/Kg) para os grupos controle, ou anticorpo RAGE, na mesma concentração, para o grupo meningite+Anti-corpo RAGE (Ac-RAGE), via cânula hipocampal, durante três dias consecutivos.

3.4 DESENHO DO MODELO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos entre os grupos experimentais Sham+Salina e Meningite+Salina para 1 e 3 dias, e em Sham + líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa), Meningite+LCRa, Meningite+AcRAGE para 10 dias. Os animais foram eutanasiados por guilhotina e o cérebro removido e dissecado em córtex pré-frontal e hipocampo para as análises dos níveis de β -amilóide, RAGE e HMGB1 por Western blotting. Estudos com modelo animal da doença de Alzheimer evidenciam que a agregação patológica do β -amilóide, ativação de RAGE e HMGB1 tem início cronicamente (Arancio et al., 2004; Armstrong, 2009; Carrano et al., 2011).

Seis dias após a indução da meningite, os animais pertencentes ao grupo 10 dias, foram submetidos a cirurgia para colocação de cânula e retornaram a sua caixa moradia. No 7º, 8º e 9º dia, os animais receberam o LCRa, para os grupos Sham+LCRa e meningite+LCRa, e anticorpo RAGE (10 μ g/Kg) para o grupo Meningite+AcRAGE, via cânula hipocampal e retornaram a sua caixa moradia. Dez dias após a indução, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de habituação ao campo aberto e reconhecimento de objetos e logo após foram eutanasiados e as estruturas cerebrais hipocampo e córtex pré-frontal foram retiradas para a análise dos níveis de β -amilóide, RAGE e HMGB1 por *Western Blotting*.

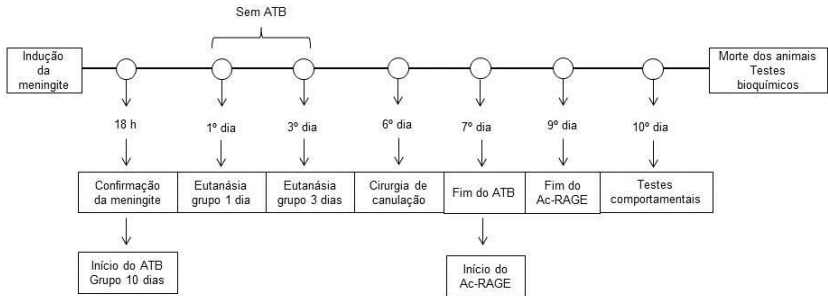


Figura 3: Representação do desenho experimental. Os animais foram induzidos ao modelo experimental de meningite, em 18 horas, foi realizada confirmação da meningite e iniciado o tratamento com ATB para o grupo 10 dias. Em 24 horas (1º dia) e em 3 dias, os animais pertencentes aos respectivos grupos, foram eutanasiados e suas estruturas cerebrais foram dissecadas e armazenadas a -80°C . No 6º dia, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica de colocação de cânula hipocampal. No 7º dia, após o término da antibioticoterapia, os animais receberam uma dose de 10 mg/Kg de Ac-RAGE, ou o mesmo equivalente de LCRa para os grupos controle, via cânula, que permaneceu até o 9º dia. Dez dias após a indução, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e, posteriormente, eutanasiados e suas estruturas cerebrais foram dissecadas e armazenadas em -80°C para as análises de *Western Blotting*. Fonte: do autor.

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais de habituação ao campo aberto e de reconhecimento de objetos foram realizados 10 dias após a indução da meningite pneumocócica.

3.5.1 Habituação ao campo aberto

Foi realizada em um campo aberto com 40 X 60 cm rodeado por paredes de 50 cm de altura sendo 3 paredes de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 retângulos iguais por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante traseiro esquerdo, e deixados a explorar o campo por 5 min (sessão de treino). Em seguida, os animais foram levados de volta para a sua gaiola, e 24h após foram novamente submetidos a uma sessão de campo aberto semelhante (sessão de teste). O cruzamento das linhas pretas (*crossing*) e levantamentos (*rearing*) realizados em ambas as sessões foram contados. A diminuição do número de cruzamentos e

levantamentos entre as duas sessões foi tomado como uma medida da retenção de habituação (Roesler et al., 2003).

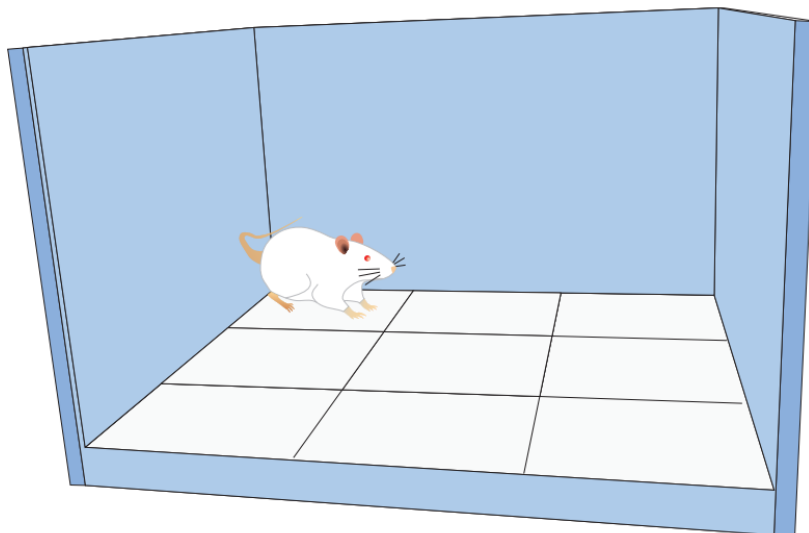


Figura 4: Teste de habituação ao campo aberto. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante traseiro esquerdo, e deixados a explorar o campo por 5 min (sessão de treino) e 24h após foram novamente submetidos a uma sessão de campo aberto semelhante (sessão de teste). O cruzamento das linhas pretas (*crossing*) e levantamentos (*rearing*) realizados em ambas as sessões foram contados. Fonte: do autor.

3.5.2 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 explorou 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) (De Lima et al., 2005).

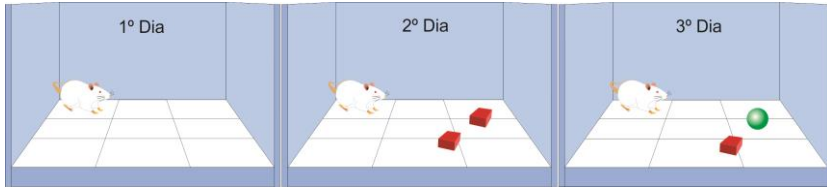


Figura 5: Teste de memória de reconhecimento de objetos. No primeiro dia foi realizado o treino, onde o animal será colocado cuidadosamente no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, no qual explorará o ambiente por 5 minutos. No segundo dia o animal foi recolocado no aparato, no qual estão dois objetos iguais, o objeto A e objeto B, e contou-se o tempo que o animal explorou cada objeto. Fonte: do autor.

3.6 TESTES BIOQUÍMICOS

3.6.1 Análise por *Western blotting*

Os níveis de β -amilóide, RAGE e HMGB1 foram analisados em amostras de estruturas cerebrais por *Western blotting*. Para tal análise, foi feito um gel preparativo em SDS-PAGE para realizar a separação eletroforética das proteínas das amostras. Após a eletroforese, colou-se o gel em tampão de transferência por 20-30 minutos por agitação. A membrana de PVDF foi cortada em dimensões ligeiramente superiores as dos gel a ser transferido e ativada, mergulhando-a em metanol por 1 minuto. Após esse período, a membrana também foi mantida em tampão de transferência por 20 a 30 minutos sob agitação. O papel filtro foi cortado nas mesmas dimensões de PVDF. As folhas foram montadas seguindo a ordem: 2 folhas de papel filtro, membrana PVDF, gel preparativo e 3 folhas de papel filtro. Em sistema blotting semi-seco. Ligou-se a voltagem a 12 V (Leal et al., 2002; Leal et al., 2006).

A revelação dos imunoblottings foi realizada através de ECL (anticorpo secundário ligado a peroxidase) e pela coloração usando NBT/BCIP (anticorpo secundário ligado a fosfatase alcalina) (Leal et al., 2002; Leal et al., 2006). Neste experimento foi utilizado 6 amostras por grupo.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

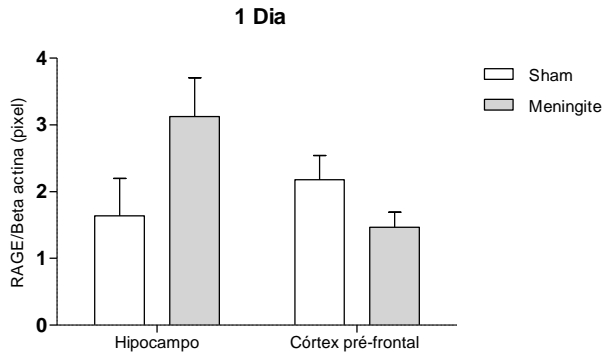
Os dados da tarefa de habituação ao campo aberto e memória de reconhecimento de objetos foram apresentados como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo t de Student e ANOVA e post hoc de Tukey. Os

dados de cada grupo foram analisados por meio do teste de *Wilcoxon*. Para as análises bioquímicas, os dados foram expressos em média \pm D.P, analisados por ANOVA de duas vias, seguidos pelo post hoc de Tukey Os dados de cada grupo foram analisados por meio do teste de *Wilcoxon*. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Science (SPSS)* versão 20.0.

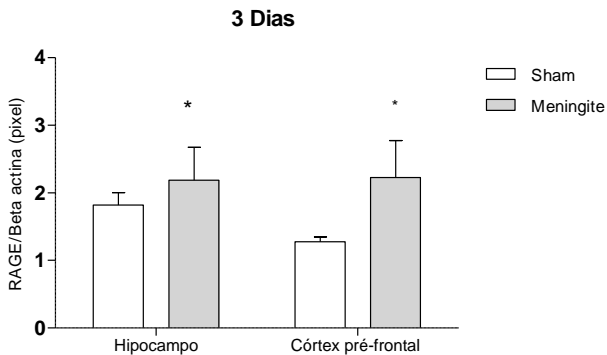
4. RESULTADOS

A expressão do receptor RAGE, em 1, 3 e 10 dias após a indução da meningite por *K. pneumoniae* é representado pela figura 6. Em 1 dia (6A) não houve a diferença na expressão do receptor em nenhuma das estruturas avaliadas. Em 3 dias (6B) após a indução, houve um aumento na expressão de RAGE no hipocampo e no córtex dos animais do grupo meningite, em comparação ao grupo Sham. Esse aumento foi observado também em 10 dias (6C) após a indução nos animais do grupo meningite, contudo, o grupo meningite que recebeu tratamento com Ac-RAGE, a expressão desse receptor foi diminuída em ambas as estruturas quando comparados ao grupo meningite.

A



B



C

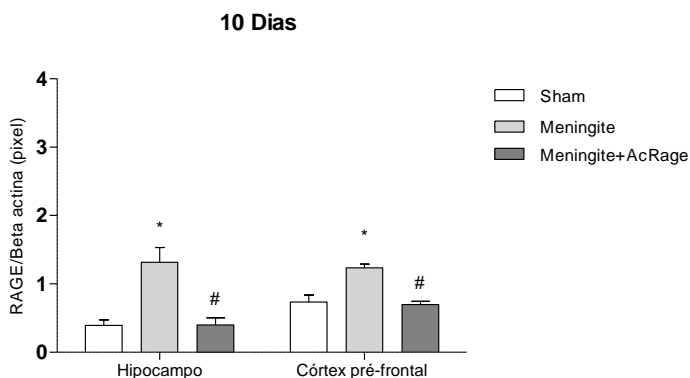
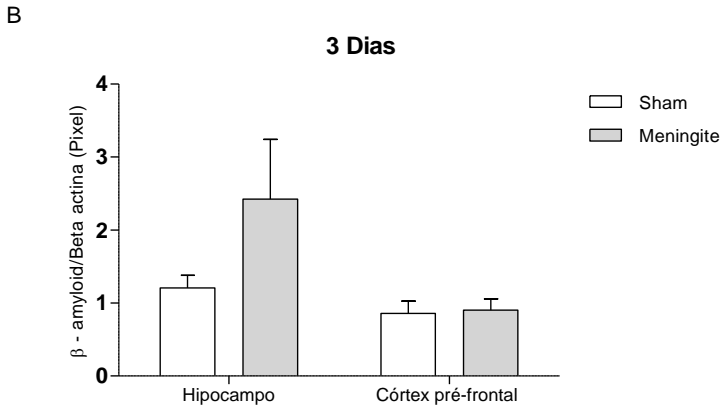
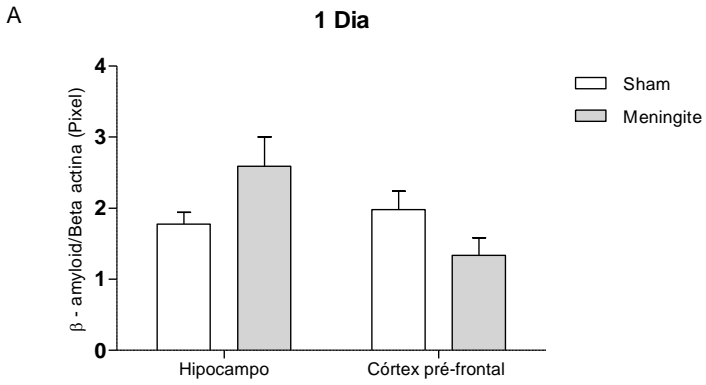


Figura 6: Expressão do receptor RAGE no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar em 1, 3 e 10 dias após a indução da meningite por *K. pneumoniae*. Os dados foram apresentados como média \pm DP e analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de *post hoc* Tukey. Para com As diferenças dentro do grupo foram analisadas pelos testes de Wilcoxon. Os símbolos * indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação ao grupo sham e # indicam diferença ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo meningite.

A figura 7 demonstra a deposição do peptídeo β -amiloide em 1, 3 e 10 dias após a indução da meningite por *K. pneumoniae*. Em 1 e 3 dias (7A e 7B) após a indução não houve aumento na deposição do mesmo em nenhuma das estruturas, em ambos os grupo, contudo, em 10 dias foi observado a deposição do peptídeo no hipocampo e no córtex dos animais pertencentes ao grupo meningite (7C). Nos animais que receberam tratamento com Ac-RAGE, a deposição do mesmo foi reduzida (7C).



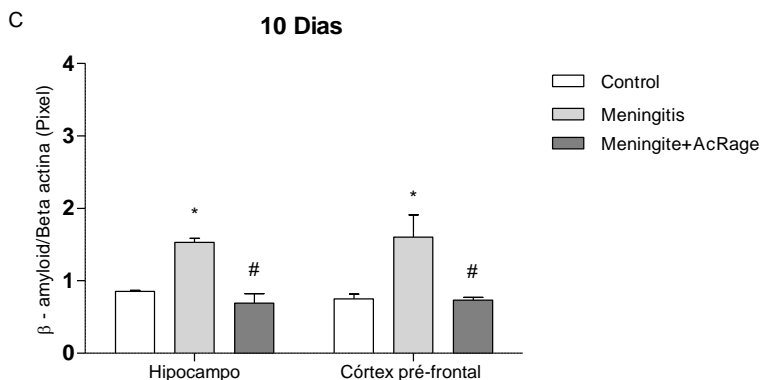
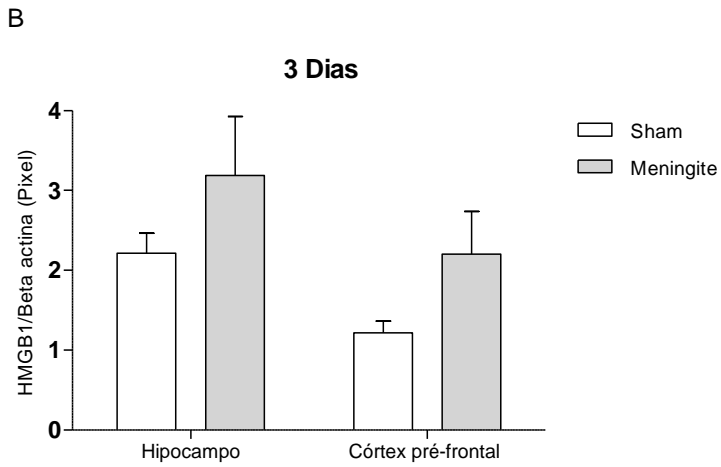
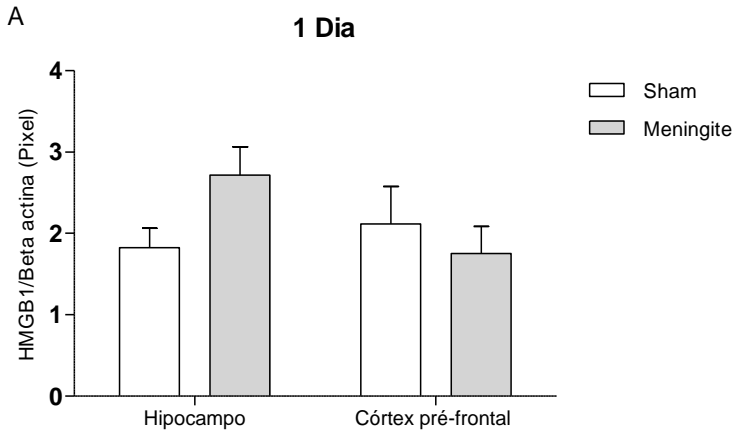


Figura 7: Deposição de β -amilóide no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar em 1, 3 e 10 dias após a indução da meningite por *K. pneumoniae*. Os dados foram apresentados como média \pm DP e analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de *pos hoc Tukey*. Para com As diferenças dentro do grupo foram analisadas pelos testes de *Wilcoxon*. Os símbolos * indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação ao grupo Sham e # indicam diferença ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo meningite.

A figura 8 demonstra os níveis de HMGB1 no em 1, 3 e 10 dias após a indução da meningite por *K. pneumoniae*. Em 1 e 3 dias (9A e 9B) após a indução não houve aumento na deposição do mesmo em nenhuma das estruturas, em ambos os grupo, contudo, em 10 dias foi observado aumento dos níveis de HMGB1 no hipocampo e no córtex dos animais pertencentes ao grupo meningite (9C). Nos animais que receberam tratamento com Ac-RAGE, a deposição do mesmo foi reduzida (9C).



C

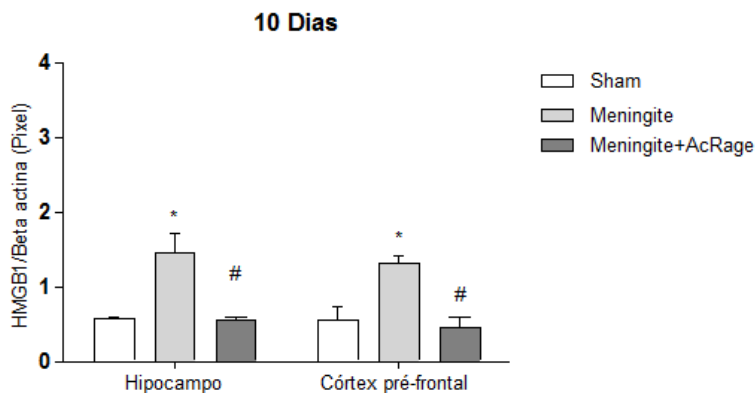


Figura 8: Níveis de HMGB1 no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar em 1, 3 e 10 dias após a indução da meningite por *K. pneumoniae*. Os dados foram apresentados como média \pm DP e analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de *pos hoc Tukey*. Para com As diferenças dentro do grupo foram analisadas pelos testes de *Wilcoxon*. Os símbolos * indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação ao grupo Sham e # indicam diferença ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo meningite

No teste comportamental de Habituação ao campo aberto (figura 9), os animais do Sham apresentaram memória de habituação entres as sessões treino e teste; contudo, nos animais do grupo meningite, esse mesmo resultado não foi observado. Ao avaliar os animais pertencentes ao grupo meningite+AcRAGE, foi observado que os mesmo não apresentaram dano a memória, sendo seu desempenho neste teste, semelhante aos animais do grupo Sham.

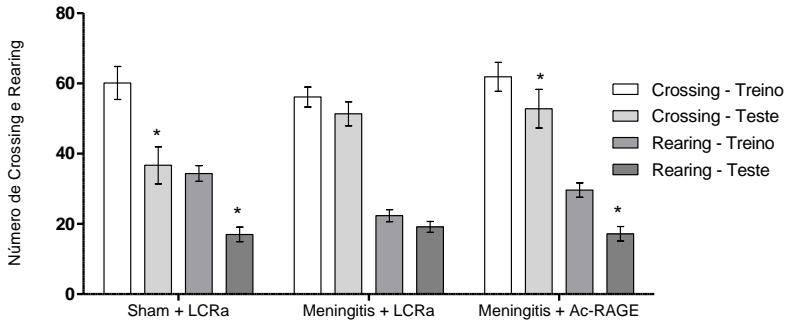


Figura 9: Teste de habituação ao campo aberto 10 dias após a indução de meningite pela *K. pneumoniae*. Os dados são expressos como média \pm EPM. *Diferença significativa entre o teste de formação (teste t pareado amostras de Student, $p < 0,05$).

A figura 10 demonstra o teste de reconhecimento de objetos realizados pelos animais submetidos a meningite por *K. pneumoniae* 10 dias após a indução. Os animais pertencentes ao grupo meningite apresentaram dano à memória de reconhecimento, enquanto que os animais do grupo meningite + Ac-RAGE obtiveram desempenho semelhante aos animais do grupo Sham.

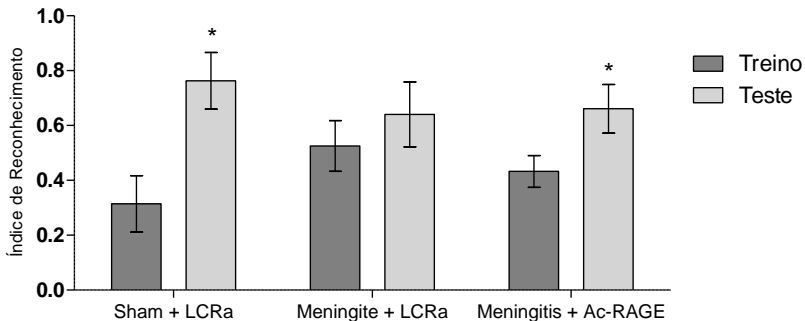


Figura 10: Teste de reconhecimento de objetos 10 dias após a indução da meningite por *K. pneumoniae*. Os dados são apresentados como média \pm EPM. Diferença significativa entre o teste de formação (teste t pareado amostras de Student, $p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo, demonstrou-se que a meningite por *K. pneumoniae* pode desencadear uma via da neurodegeneração através da sub-regulação do receptor RAGE, aumentando a deposição de níveis de β -amilóide e HMGB-1 no hipocampo e no córtex pré-frontal.

Infecções no cérebro promovem a inflamação, a invasão de leucócitos e estimulação a microglia. Uma vez ativada, a microglia libera efetores solúveis, tais como radicais livres, proteases, citocinas, aminoácidos excitatórios e HMGB1 (Gerber et al., 2010). O NF- κ B exerce um papel importante na inflamação, estresse oxidativo e apoptose. Em resposta a estímulos inflamatórios, HMGB-1 é secretado por macrófagos ativados (Wang et al., 1999; Bonaldi et al., 2003), células dendríticas mielóides (Lotze et al., 2005) e astrócitos (Maroso et al., 2011), ativando o receptor RAGE e outros receptores, incluindo TLR-2 e TLR-4 (Scaffidi et al., 2002; Parker et al., 2004). Os mediadores pró-inflamatórios liberados destas vias podem aumentar a produção de peptídeo β -amilóide. Em seguida, este peptídeo liga-se ao receptor RAGE, mantendo uma elevada ativação inflamatória e a deposição de β -amilóide nas estruturas cerebrais (Mcgeer et al., 1987; Chen et al., 2016).

Em um estudo de Barichello et al (2014), onde foi demonstrado os efeitos da meningite por *K. pneumoniae* sobre um modelo experimental, foi observado que os níveis de IL-1 β , TNF- α , CINC-1, IL-6 e BDNF, encontraram-se elevados nas estruturas cerebrais em diferentes tempos após a indução da meningite (Barichello et al., 2014). Estudos In vivo e in vitro tem demonstrado que a ativação de células da microglia, desencadeada pela ligação do β -amilóide ao receptor toll-like-4 (TLR4) promove a liberação exacerbada de mediadores inflamatórios, dentre eles a IL-1 β , TNF- α e EROs (Van Zoelen et al., 2011), todos os quais pode resultar em degeneração neuronal e acelerar a progressão da doença de Alzheimer (Hanamsagar et al., 2012). Os resultados desse estudo mostraram haver um aumento na deposição de do peptídeo β -amilóide e expressões de RAGE e HMGB1 no cérebro de ratos submetidos à meningite por *K. pneumoniae*.

Em um modelo experimental de sepse, o bloqueio da expressão de RAGE ou a sua atividade reduziram a resposta inflamatória (Hofmann et al., 1999). RAGE é expressão em todos os tecidos em uma ampla gama de tipos de células, incluindo as células envolvidas no sistema imune inato e adaptativo, e desempenha um papel fundamental

em diversos processos inflamatórios (Giamarellou, 2005; Giamarellos-Bourboulis et al., 2009). Além disso, inibir a agregação de β -amilóide e bloquear o eixo RAGE/ β -amilóide poderia ser um alvo para prevenir o comprometimento cognitivo de longo prazo em sobreviventes da doença de Alzheimer e sepse (Bhatt et al., 2009; Liesz et al., 2015).

Em um estudo desenvolvido por Cho et al (2009), foi demonstrado que a produção e deposição de BACE1 e a ativação e translocação do fator nuclear de células T1 ativadas (NFAT1) para o núcleo ocorre em resposta a expressão de RAGE, que também é responsável por estimular a expressão funcional de BACE1 através da ativação de NFAT1, resultando em uma maior deposição de β -amilóide no cérebro. O mesmo autor sugere ainda, que o RAGE exerce um papel fundamental da doença de doença de Alzheimer e sua importância como potencial alvo terapêutico (Cho et al., 2009).

Em um modelo experimental de sepse, em que foi usado remifentanil como tratamento adjuvante, observou-se uma diminuição na expressão de HMGB1 e atividade de NF- κ B em múltiplos órgãos (Seo et al., 2017). Pacientes com sepse grave ou meningite apresentaram elevação dos níveis de HMGB-1. Este DAMP foi associado a uma inflamação prolongada, e piora a doença na sepse e meningite pneumocócica (Ueno et al., 2004; Hohne et al., 2013). Van Zoelen (2011) também relatou que muitas investigações sobre expressões de HMGB-1 são realizadas em pacientes com sepse em unidades de tratamento intensivo (UTIs), onde a taxa de mortalidade desta doença é maior (Van Zoelen et al., 2011).

Nossos resultados são consistentes com esta conclusão, onde os níveis de RAGE, o HMGB1 e o β -amilóide foram maiores no hipocampo e córtex pré-frontal em 10 dias, mas que esses níveis são reestabilizados quando é realizado o uso do Ac-RAGE. Demonstramos ainda que o RAGE no córtex pré-frontal em 3 dias encontra-se elevado, levando-nos a acreditar que esse é o primeiro mediador a ser ativado na via do eixo β -amilóide-RAGE.

Em outro estudo foi demonstrados que animais sobreviventes à meningite ou a sepse, mantêm uma liberação de mediadores pró-inflamatórios e esses mediadores foram associados a um comprometimento cognitivo de longo prazo (Barichello et al., 2007). O bloqueio da cascata pró-inflamatória impediu o comprometimento cognitivo após meningite bacteriana experimental e sepse (Mina et al., 2014; Barichello et al., 2015).

Em um estudo de Chen et al (2002) foi constatado que os níveis de BACE1 e NF- κ B encontram-se aumentados em cérebro de pacientes com doença de Alzheimer (Chen et al., 2012). A ativação da via NF- κ B desempenha um papel importante na fisiopatologia da doença de Alzheimer, e bloqueando a ativação dessa via tem demonstrado a atenuação da disfunção cognitiva (Cai, Zhao, Yao, et al., 2011). O uso de Trien reduziu os níveis de AGES, e com isso, diminuiu a deposição de β -amilóide e perda de sinapse no cérebro de animais induzidos a doença de Alzheimer. Neste mesmo estudo, foi observado a inibição da BACE1, demonstrando que o uso do Trien inibe a via β -amilóide, incluindo a regulação de RAGE e NF- κ B, revertendo assim, a disfunção cognitiva (Wang et al., 2013).

Alguns estudos vêm indicando que a glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) pode desempenhar um papel importante no processamento de APP, modulando assim a atividade γ -secretase, facilitando a produção de β -amilóide (Cohen et al., 2004). No estudo de Ly et al (2013) mostrou que a inibição da sinalização da GSK3 reduziu a deposição de β -amilóide e a formação de placas neuríticas, revertendo ainda danos a memória de animais transgênicos do modelo de doença de Alzheimer (Ly et al., 2013).

O estudo de Barichello et al (2014), demonstrou ainda que, os animais sobreviventes a meningite por *K. pneumoniae*, apresentaram dano a memória de habituação (Barichello et al., 2014), dados esses, também encontrados neste estudo. Um potencial fator para o declínio na memória durante a meningite por *k. pneumoniae*, poderia estar correlacionada ao processo inflamatório que acomete o hipocampo e córtex pré-frontal, isto porque, os mediadores inflamatórios estando elevados podem ter um efeito nocivo sobre a função cognitiva e de memória (Mcafoose et al., 2009; Yirmiya et al., 2011; Barichello et al., 2014).

Na tentativa de minimizar os danos a memória de aprendizagem, já observados devido a deposição de β -amilóide nos tecidos cerebrais, Chen et al (2016) realizaram um estudo utilizando Chotosan, um medicamento a base de plantas ocidentais tradicionais, com a finalidade de reverter tal dano; tal estudo demonstrou que o tratamento com a droga, além melhorar o dano a memória, ainda foi capaz de reduzir a expressão de NF- κ B, p65 e TLR-4, mediadores esses, que estão envolvidos na via de sinalização do β -amilóide/RAGE (Chen et al., 2016).

Estudos em torno de inibir a ativação de RAGE também vêm ganhando grande demanda nos últimos anos. Um estudo usando Quercetina como inibidor da via de sinalização do RAGE mostrou que o mesmo fez com a memória de aprendizagem melhorasse, ao comparar com os grupos que não o receberam, validando a hipótese de que a Quercetina exerce proteção neurovascular nos animais, além de melhorar dos sistemas colinérgicos e a modulação microvascular (Liu et al., 2013).

6 CONCLUSÃO

Este estudo testemunhou que animais sobreviventes a meningite por *K. pneumoniae* apresentam aumento nos níveis de HMGB1, deposição de β -amilóide e da expressão de RAGE no hipocampo e córtex pré-frontal, sendo este último, já expresso em 3 dias após a indução da meningite, sugerindo ser ele o mediador principal da via do peptídeo β -amilóide e o primeiro a ser expresso

Danos a memória foram confirmados neste mesmo estudo, levando a entender que toda a cascata de mediadores descritos em um outro estudo do mesmo grupo (Barichello et al., 2014) esteja de fato envolvida nessa mesma via de sinalização do β -amilóide/RAGE. O uso de um mediador, que tivesse como função inibir a ativação dessa via, foi proposto e evidenciou que exercer função protetora, tanto na memória do modelo, como inibir o aumento dos níveis de HMGB1, deposição de β -amilóide e da expressão de RAGE. Embora nosso estudo seja capaz de elucidar a ligação entre doenças infecciosas e marcadores neurodegenerativos, outros estudos sobre os mecanismos envolvidos precisam ser realizados.

REFÊRENCIAS

Abbott, NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 2002. 200; (6): 629-38.

Abrahamo, AL; Focaccia, R; Gattaz, WF. Childhood meningitis increases the risk for adult schizophrenia. *World J Biol Psychiatry.* 2005. 6 Suppl 2; 44-8.

Agyeman, PG, D.; Leib, S. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial infections. In: (Ed.). *Infections of the Central Nervous System.* USA: Wolters Kluwer Health, v.4, 2014. p.928 páginas.

Alafuzoff, I; Adolfsson, R; Bucht, G; Winblad, B. Albumin and immunoglobulin in plasma and cerebrospinal fluid, and blood-cerebrospinal fluid barrier function in patients with dementia of Alzheimer type and multi-infarct dementia. *J Neurol Sci.* 1983. 60; (3): 465-72.

Allan, SM; Rothwell, NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2001. 2; (10): 734-44.

Arancio, O; Zhang, HP; Chen, X; Lin, C; Trinchese, F; Puzzo, D; Liu, S; Hegde, A; Yan, SF; Stern, A; Luddy, JS; Lue, LF; Walker, DG; Roher, A; Buttini, M; Mucke, L; Li, W; Schmidt, AM; Kindy, M; Hyslop, PA; Stern, DM; Du Yan, SS. RAGE potentiates Abeta-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. *Embo j.* 2004. 23; (20): 4096-105.

Armstrong, RA. The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2009. 47; (4): 289-99.

Armulik, A; Genove, G; Mae, M; Nisancioglu, MH; Wallgard, E; Niaudet, C; He, L; Norlin, J; Lindblom, P; Strittmatter, K; Johansson, BR; Betsholtz, C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 2010. 468; (7323): 557-61.

Atamna, H; Boyle, K. Amyloid-beta peptide binds with heme to form a peroxidase: relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. 103; (9): 3381-6.

Azuma, H; Tsuda, N; Sasaki, K; Okuno, A. Clinical significance of cytokine measurement for detection of meningitis. *J Pediatr*. 1997. 131; (3): 463-5.

Baraff, LJ; Lee, SI; Schriger, DL. Outcomes of bacterial meningitis in children: a meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 1993. 12; (5): 389-94.

Barichello, T; Generoso, JS; Simoes, LR; Sharin, VG; Ceretta, RA; Domingui, D; Comim, CM; Vilela, MC; Teixeira, AL; Quevedo, J. Interleukin-1beta Receptor Antagonism Prevents Cognitive Impairment Following Experimental Bacterial Meningitis. *Curr Neurovasc Res*. 2015. 12; (3): 253-61.

Barichello, T; Martins, MR; Reinke, A; Constantino, LS; Machado, RA; Valvassori, SS; Moreira, JC; Quevedo, J; Dal-Pizzol, F. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res*. 2007. 40; (6): 831-7.

Barichello, T; Savi, GD; Simões, LR; Generoso, JS; Fraga, DB; Bellettini, G; Daufenbach, JF; Rezin, GT; Scaini, G; Streck, EL. Evaluation of mitochondrial respiratory chain in the brain of rats after pneumococcal meningitis. *Brain Research Bulletin*. 2010. 82; (5-6): 302-07.

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

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.

Bhatt, S; Bhatt, RS; Zalzman, SS; Siegel, A. Peripheral and central mediators of lipopolysaccharide induced suppression of defensive rage behavior in the cat. *Neuroscience*. 2009. 163; (4): 1002-11.

Bierer, LM; Hof, PR; Purohit, DP; Carlin, L; Schmeidler, J; Davis, KL; Perl, DP. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol*. 1995. 52; (1): 81-8.

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.

Bonaldi, T; Talamo, F; Scaffidi, P; Ferrera, D; Porto, A; Bachi, A; Rubartelli, A; Agresti, A; Bianchi, ME. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *Embo j*. 2003. 22; (20): 5551-60.

Brandt, CT. Experimental studies of pneumococcal meningitis. *Dan Med Bull*. 2010. 57; (1):

Brandt, CT; Caye-Thomasen, P; Lund, SP; Worsoe, L; Ostergaard, C; Frimodt-Moller, N; Espersen, F; Thomsen, J; Lundgren, JD. Hearing loss and cochlear damage in experimental pneumococcal meningitis, with special reference to the role of neutrophil granulocytes. *Neurobiol Dis*. 2006. 23; (2): 300-11.

Brion, JP. Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *Eur Neurol*. 1998. 40; (3): 130-40.

Buggia-Prevot, V; Sevalle, J; Rossner, S; Checler, F. NFkappaB-dependent control of BACE1 promoter transactivation by Abeta42. *J Biol Chem*. 2008. 283; (15): 10037-47.

Burton, CR; Meredith, JE; Barten, DM; Goldstein, ME; Krause, CM; Kieras, CJ; Sisk, L; Iben, LG; Polson, C; Thompson, MW; Lin, XA; Corsa, J; Fiedler, T; Pierdomenico, M; Cao, Y; Roach, AH; Cantone, JL; Ford, MJ; Drexler, DM; Olson, RE; Yang, MG; Bergstrom, CP; Mcelhone, KE; Bronson, JJ; Macor, JE; Blat, Y; Grafstrom, RH; Stern, AM; Seiffert, DA; Zaczek, R; Albright, CF; Toyn, JH. The amyloid-beta rise and gamma-secretase inhibitor potency depend on the level of substrate expression. *J Biol Chem*. 2008. 283; (34): 22992-3003.

Butterfield, DA. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res*. 2002. 36; (12): 1307-13.

Butterfield, DA; Griffin, S; Munch, G; Pasinetti, GM. Amyloid beta-peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer's disease brain exists. *J Alzheimers Dis.* 2002. 4; (3): 193-201.

Butterfield, DA; Reed, T; Perluigi, M; De Marco, C; Coccia, R; Cini, C; Sultana, R. Elevated protein-bound levels of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, in brain from persons with mild cognitive impairment. *Neurosci Lett.* 2006. 397; (3): 170-3.

Cai, Z; Zhao, B; Ratka, A. Oxidative stress and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* 2011. 13; (4): 223-50.

Cai, Z; Zhao, Y; Yao, S; Bin Zhao, B. Increases in beta-amyloid protein in the hippocampus caused by diabetic metabolic disorder are blocked by minocycline through inhibition of NF-kappaB pathway activation. *Pharmacol Rep.* 2011. 63; (2): 381-91.

Cardoso, FL; Brites, D; Brito, MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev.* 2010. 64; (2): 328-63.

Carnevale, D; Perrotta, M; Lembo, G; Trimarco, B. Pathophysiological Links Among Hypertension and Alzheimer's Disease. *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2016. 23; (1): 3-7.

Carrano, A; Hoozemans, JJ; Van Der Vies, SM; Rozemuller, AJ; Van Horsen, J; De Vries, HE. Amyloid Beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Antioxid Redox Signal.* 2011. 15; (5): 1167-78.

Chami, L; Checler, F. BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and beta-amyloid production in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2012. 7; 52.

Chen, CH; Zhou, W; Liu, S; Deng, Y; Cai, F; Tone, M; Tone, Y; Tong, Y; Song, W. Increased NF-kappaB signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2012. 15; (1): 77-90.

Chen, CJ; Lin, CL; Chen, YC; Wang, CW; Chiu, CH; Lin, TY; Huang, YC. Host and microbiologic factors associated with mortality in

Taiwanese children with invasive pneumococcal diseases, 2001 to 2006. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009. 63; (2): 194-200.

Chen, L; Hu, L; Zhao, J; Hong, H; Feng, F; Qu, W; Liu, W. Chotosan improves Abeta1-42-induced cognitive impairment and neuroinflammatory and apoptotic responses through the inhibition of TLR-4/NF-kappaB signaling in mice. *J Ethnopharmacol*. 2016. 191; 398-407.

Cho, HJ; Son, SM; Jin, SM; Hong, HS; Shin, DH; Kim, SJ; Huh, K; Mook-Jung, I. RAGE regulates BACE1 and Abeta generation via NFAT1 activation in Alzheimer's disease animal model. *Faseb j*. 2009. 23; (8): 2639-49.

Cohen, P; Goedert, M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2004. 3; (6): 479-87.

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 Strooper, B; Annaert, W; Cupers, P; Saftig, P; Craessaerts, K; Mumm, JS; Schroeter, EH; Schrijvers, V; Wolfe, MS; Ray, WJ; Goate, A; Kopan, R. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. 1999. 398; (6727): 518-22.

Deane, R; Singh, I; Sagare, AP; Bell, RD; Ross, NT; Larue, B; Love, R; Perry, S; Paquette, N; Deane, RJ; Thiyagarajan, M; Zarcone, T; Fritz, G; Friedman, AE; Miller, BL; Zlokovic, BV. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid beta-mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2012. 122; (4): 1377-92.

Donahue, JE; Flaherty, SL; Johanson, CE; Duncan, JA, 3rd; Silverberg, GD; Miller, MC; Tavares, R; Yang, W; Wu, Q; Sabo, E; Hovanesian, V; Stopa, EG. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2006. 112; (4): 405-15.

Engelhardt, B. Regulation of immune cell entry into the central nervous system. *Results Probl Cell Differ*. 2006. 43; 259-80.

Epidemiologia, CND. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, 2005. ISBN 9788533410480. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=sCNgAAAAMAAJ>>.

Erickson, MA; Banks, WA. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2013. 33; (10): 1500-13.

Fang, F; Lue, LF; Yan, S; Xu, H; Luddy, JS; Chen, D; Walker, DG; Stern, DM; Yan, S; Schmidt, AM; Chen, JX; Yan, SS. RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Faseb j*. 2010. 24; (4): 1043-55.

Ford, MJ; Cantone, JL; Polson, C; Toyn, JH; Meredith, JE; Drexler, DM. Qualitative and quantitative characterization of the amyloid beta peptide (Abeta) population in biological matrices using an immunoprecipitation-LC/MS assay. *J Neurosci Methods*. 2008. 168; (2): 465-74.

Fritz, D; Brouwer, MC; Van De Beek, D. Dexamethasone and long-term survival in bacterial meningitis. *Neurology*. 2012. 79; (22): 2177-9.

Furukawa, K; Sopher, BL; Rydel, RE; Begley, JG; Pham, DG; Martin, GM; Fox, M; Mattson, MP. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem*. 1996. 67; (5): 1882-96.

Garcia-Alloza, M; Dodwell, SA; Meyer-Luehmann, M; Hyman, BT; Bacskai, BJ. Plaque-derived oxidative stress mediates distorted neurite trajectories in the Alzheimer mouse model. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006. 65; (11): 1082-9.

Gerber, J; Nau, R. Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol*. 2010. 23; (3): 312-8.

Ghersi-Egea, JF; Gorevic, PD; Ghiso, J; Frangione, B; Patlak, CS; Fenstermacher, JD. Fate of cerebrospinal fluid-borne amyloid beta-peptide: rapid clearance into blood and appreciable accumulation by cerebral arteries. *J Neurochem*. 1996. 67; (2): 880-3.

Giamarellos-Bourboulis, EJ; Douzinas, EE; Tsaganos, T; Pagoulatou, A; Livaditi, O; Vafiadou, M; Kanellakopoulou, K. Cerebrospinal fluid of patients administered moxifloxacin modulates the secretion of cytokines from human monocytes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009. 63; (1): 62-9.

Giamarellou, H. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect*. 2005. 11 Suppl 4; 1-16.

Gong, W; Zheng, Y; Chao, F; Li, Y; Xu, Z; Huang, G; Gao, X; Li, S; He, F. The anti-inflammatory activity of HMGB1 A box is enhanced when fused with C-terminal acidic tail. *J Biomed Biotechnol*. 2010. 2010; 915234.

Gonzalez-Burgos, G; Fish, KN; Lewis, DA. GABA neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia. *Neural Plast*. 2011. 2011; 723184.

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

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

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

Haapasalo, A; Viswanathan, J; Bertram, L; Soininen, H; Tanzi, RE; Hiltunen, M. Emerging role of Alzheimer's disease-associated ubiquitin-1 in protein aggregation. *Biochem Soc Trans*. 2010. 38; (Pt 1): 150-5.

Haberl, RL; Anneser, F; Kodel, U; Pfister, HW. Is nitric oxide involved as a mediator of cerebrovascular changes in the early phase of experimental pneumococcal meningitis? *Neurol Res*. 1994. 16; (2): 108-12.

Han, SH; Kim, YH; Mook-Jung, I. RAGE: the beneficial and deleterious effects by diverse mechanisms of actions. *Mol Cells*. 2011. 31; (2): 91-7.

Hanamsagar, R; Hanke, ML; Kielian, T. Toll-like receptor (TLR) and Inflammasome Actions in the Central Nervous System: New and Emerging Concepts. *Trends in Immunology*. 2012. 33; (7): 333-42.

Hofmann, MA; Drury, S; Fu, C; Qu, W; Taguchi, A; Lu, Y; Avila, C; Kambham, N; Bierhaus, A; Nawroth, P; Neurath, MF; Slattery, T; Beach, D; McClary, J; Nagashima, M; Morser, J; Stern, D; Schmidt, AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. 1999. 97; (7): 889-901.

Hohne, C; Wenzel, M; Angele, B; Hammerschmidt, S; Hacker, H; Klein, M; Bierhaus, A; Sperandio, M; Pfister, HW; Koedel, U. High mobility group box 1 prolongs inflammation and worsens disease in pneumococcal meningitis. *Brain*. 2013. 136; (Pt 6): 1746-59.

Hollands, C; Bartolotti, N; Lazarov, O. Alzheimer's Disease and Hippocampal Adult Neurogenesis; Exploring Shared Mechanisms. *Frontiers in Neuroscience*. 2016. 10; 178.

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.

Huang, X; Atwood, CS; Hartshorn, MA; Multhaup, G; Goldstein, LE; Scarpa, RC; Cuajungco, MP; Gray, DN; Lim, J; Moir, RD; Tanzi, RE; Bush, AI. The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry*. 1999. 38; (24): 7609-16.

Huang, X; Cuajungco, MP; Atwood, CS; Hartshorn, MA; Tyndall, JD; Hanson, GR; Stokes, KC; Leopold, M; Multhaup, G; Goldstein, LE; Scarpa, RC; Saunders, AJ; Lim, J; Moir, RD; Glabe, C; Bowden, EF; Masters, CL; Fairlie, DP; Tanzi, RE; Bush, AI. Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J Biol Chem*. 1999. 274; (52): 37111-6.

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

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

Irazuzta, JE; Pretzlaff, RK; Zingarelli, B; Xue, V; Zemlan, F. Modulation of nuclear factor-kappaB activation and decreased markers of neurological injury associated with hypothermic therapy in experimental bacterial meningitis. *Crit Care Med.* 2002. 30; (11): 2553-9.

Janeway, C. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença.* Artmed, 2007. ISBN 9788536307411. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=xJEBAAACAAJ>>.

Johnson, VE; Stewart, W; Smith, DH. Traumatic brain injury and amyloid-beta pathology: a link to Alzheimer's disease? *Nat Rev Neurosci.* 2010. 11; (5): 361-70.

Kagan, BL; Hirakura, Y; Azimov, R; Azimova, R; Lin, MC. The channel hypothesis of Alzheimer's disease: current status. *Peptides.* 2002. 23; (7): 1311-5.

Kang, J; Park, EJ; Jou, I; Kim, JH; Joe, EH. Reactive oxygen species mediate A beta(25-35)-induced activation of BV-2 microglia. *Neuroreport.* 2001. 12; (7): 1449-52.

Kim, HC; Yamada, K; Nitta, A; Olariu, A; Tran, MH; Mizuno, M; Nakajima, A; Nagai, T; Kamei, H; Jhoo, WK; Im, DH; Shin, EJ; Hjelle, OP; Ottersen, OP; Park, SC; Kato, K; Mirault, ME; Nabeshima, T. Immunocytochemical evidence that amyloid beta (1-42) impairs endogenous antioxidant systems in vivo. *Neuroscience.* 2003. 119; (2): 399-419.

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

Kim, YS; Sheldon, RA; Elliott, BR; Liu, Q; Ferriero, DM; Tauber, MG. Brain injury in experimental neonatal meningitis due to group B streptococci. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1995. 54; (4): 531-9.

Ko, WC; Paterson, DL; Sagnimeni, AJ; Hansen, DS; Von Gottberg, A; Mohapatra, S; Casellas, JM; Goossens, H; Mulazimoglu, L; Trenholme, G; Klugman, KP; McCormack, JG; Yu, VL. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis.* 2002. 8; (2): 160-6.

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

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

Koedel, U; Scheld, WM; Pfister, H-W. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *The Lancet Infectious Diseases.* 2002. 2; (12): 721-36.

Koo, EH; Sisodia, SS; Archer, DR; Martin, LJ; Weidemann, A; Beyreuther, K; Fischer, P; Masters, CL; Price, DL. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990. 87; (4): 1561-5.

Krstic, D; Knuesel, I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2013. 9; (1): 25-34.

Laferla, FM; Green, KN; Oddo, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2007. 8; (7): 499-509.

Lammich, S; Kojro, E; Postina, R; Gilbert, S; Pfeiffer, R; Jasionowski, M; Haass, C; Fahrenholz, F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. 96; (7): 3922-7.

Leal, RB; Cordova, FM; Herd, L; Bobrovskaya, L; Dunkley, PR. Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002. 178; (1): 44-51.

Leal, RB; Ribeiro, SJ; Posser, T; Cordova, FM; Rigon, AP; Zaniboni Filho, E; Bairy, AC. Modulation of ERK1/2 and p38(MAPK) by lead in the cerebellum of Brazilian catfish *Rhamdia quelen*. *Aquat Toxicol*. 2006. 77; (1): 98-104.

Leib, SL; Kim, YS; Chow, LL; Sheldon, RA; Tauber, MG. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *J Clin Invest*. 1996. 98; (11): 2632-9.

Leib, SL; Leppert, D; Clements, J; Tauber, MG. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun*. 2000. 68; (2): 615-20.

Leppert, D; Leib, SL; Grygar, C; Miller, KM; Schaad, UB; Hollander, GA. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin Infect Dis*. 2000. 31; (1): 80-4.

Liesz, A; Dalpke, A; Mracsko, E; Antoine, DJ; Roth, S; Zhou, W; Yang, H; Na, SY; Akhisaroglu, M; Fleming, T; Eigenbrod, T; Nawroth, PP; Tracey, KJ; Veltkamp, R. DAMP signaling is a key pathway inducing immune modulation after brain injury. *J Neurosci*. 2015. 35; (2): 583-98.

Liu, R; Zhang, TT; Zhou, D; Bai, XY; Zhou, WL; Huang, C; Song, JK; Meng, FR; Wu, CX; Li, L; Du, GH. Quercetin protects against the Abeta(25-35)-induced amnesic injury: involvement of inactivation of rage-mediated pathway and conservation of the NVU. *Neuropharmacology*. 2013. 67; 419-31.

Lotze, MT; Tracey, KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005. 5; (4): 331-42.

Lu, CH; Chang, WN; Chang, HW. *Klebsiella meningitis in adults: clinical features, prognostic factors and therapeutic outcomes*. *J Clin Neurosci*. 2002. 9; (5): 533-8.

Lu, CH; Chang, WN; Chuang, YC; Chang, HW. Gram-negative bacillary meningitis in adult post-neurosurgical patients. *Surg Neurol*. 1999. 52; (5): 438-43; discussion 43-4.

Lu, CH; Chang, WN; Lin, YC; Tsai, NW; Liliang, PC; Su, TM; Rau, CS; Tsai, YD; Liang, CL; Chang, CJ; Lee, PY; Chang, HW; Wu, JJ. Bacterial brain abscess: microbiological features, epidemiological trends and therapeutic outcomes. *Qjm*. 2002. 95; (8): 501-9.

Ly, PTT; Wu, Y; Zou, H; Wang, R; Zhou, W; Kinoshita, A; Zhang, M; Yang, Y; Cai, F; Woodgett, J; Song, W. Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013. 123; (1): 224-35.

Macleod, R; Hillert, EK; Cameron, RT; Baillie, GS. The role and therapeutic targeting of alpha-, beta- and gamma-secretase in Alzheimer's disease. *Future Sci OA*. 2015. 1; (3): Fso11.

Maroso, M; Balosso, S; Ravizza, T; Liu, J; Bianchi, ME; Vezzani, A. Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signalling in epilepsy: the importance of IL-1beta and high-mobility group box 1. *J Intern Med*. 2011. 270; (4): 319-26.

Martin-Moreno, AM; Reigada, D; Ramirez, BG; Mechoulam, R; Innamorato, N; Cuadrado, A; De Ceballos, ML. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol*. 2011. 79; (6): 964-73.

Matsubara, E; Ghiso, J; Frangione, B; Amari, M; Tomidokoro, Y; Ikeda, Y; Harigaya, Y; Okamoto, K; Shoji, M. Lipoprotein-free amyloidogenic peptides in plasma are elevated in patients with sporadic Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Ann Neurol*. 1999. 45; (4): 537-41.

Matsui, T; Ingelsson, M; Fukumoto, H; Ramasamy, K; Kowa, H; Frosch, MP; Irizarry, MC; Hyman, BT. Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2007. 1161; 116-23.

Mcafoose, J; Baune, BT. Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009. 33; (3): 355-66.

Mcgeer, PL; Itagaki, S; Tago, H; Mcgeer, EG. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neuroscience Letters*. 1987. 79; (1-2): 195-200.

Mclellan, ME; Kajdasz, ST; Hyman, BT; Bacskai, BJ. In vivo imaging of reactive oxygen species specifically associated with thioflavine S-positive amyloid plaques by multiphoton microscopy. *J Neurosci.* 2003. 23; (6): 2212-7.

Mehta, PD; Pirttila, T; Patrick, BA; Barshatzky, M; Mehta, SP. Amyloid beta protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease. *Neurosci Lett.* 2001. 304; (1-2): 102-6.

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

Mercurio, F; Manning, AM. NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene.* 1999. 18; (45): 6163-71.

Metz, VV; Kojro, E; Rat, D; Postina, R. Induction of RAGE Shedding by Activation of G Protein-Coupled Receptors. *PLoS ONE.* 2012. 7; (7): e41823.

Meyer-Luehmann, M; Spires-Jones, TL; Prada, C; Garcia-Alloza, M; De Calignon, A; Rozkalne, A; Koenigsknecht-Talboo, J; Holtzman, DM; Bacskai, BJ; Hyman, BT. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature.* 2008. 451; (7179): 720-4.

Mina, F; Comim, CM; Dominghini, D; Cassol-Jr, OJ; Dall Igna, DM; Ferreira, GK; Silva, MC; Galant, LS; Streck, EL; Quevedo, J; Dal-Pizzol, F. III-beta involvement in cognitive impairment after sepsis. *Mol Neurobiol.* 2014. 49; (2): 1069-76.

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

Nathalie, P; Jean-Noel, O. Processing of amyloid precursor protein and amyloid peptide neurotoxicity. *Curr Alzheimer Res.* 2008. 5; (2): 92-9.

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

Nelson, AL; Roche, AM; Gould, JM; Chim, K; Ratner, AJ; Weiser, JN. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun.* 2007. 75; (1): 83-90.

O'Brien, KL; Wolfson, LJ; Watt, JP; Henkle, E; Deloria-Knoll, M; McCall, N; Lee, E; Mulholland, K; Levine, OS; Cherian, T. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet.* 2009. 374; (9693): 893-902.

Oe, T; Ackermann, BL; Inoue, K; Berna, MJ; Garner, CO; Gelfanova, V; Dean, RA; Siemers, ER; Holtzman, DM; Farlow, MR; Blair, IA. Quantitative analysis of amyloid beta peptides in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients by immunoaffinity purification and stable isotope dilution liquid chromatography/negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006. 20; (24): 3723-35.

Ostergaard, C; Leib, SL; Rowland, I; Brandt, CT. Bacteremia causes hippocampal apoptosis in experimental pneumococcal meningitis. *BMC Infect Dis.* 2010. 10; 1.

Pan, W; Stone, KP; Hsuchou, H; Manda, VK; Zhang, Y; Kastin, AJ. Cytokine Signaling Modulates Blood-Brain Barrier Function. *Current pharmaceutical design.* 2011. 17; (33): 3729-40.

Paola, D; Domenicotti, C; Nitti, M; Vitali, A; Borghi, R; Cottalasso, D; Zaccaro, D; Odetti, P; Strocchi, P; Marinari, UM; Tabaton, M; Pronzato, MA. Oxidative stress induces increase in intracellular amyloid beta-protein production and selective activation of betaI and betaII PKCs in NT2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000. 268; (2): 642-6.

Parker, LC; Whyte, MK; Vogel, SN; Dower, SK; Sabroe, I. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists regulate CCR expression in human monocytic cells. *J Immunol.* 2004. 172; (8): 4977-86.

Pratico, D; Uryu, K; Leight, S; Trojanoswki, JQ; Lee, VM. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci*. 2001. 21; (12): 4183-7.

Querfurth , HW; Laferla , FM. Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*. 2010. 362; (4): 329-44.

Roesler, R; Schroder, N; Vianna, MR; Quevedo, J; Bromberg, E; Kapczinski, F; Ferreira, MB. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res*. 2003. 975; (1-2): 207-13.

Roos, KL; Van De Beek, D. Bacterial meningitis. *Handb Clin Neurol*. 2010. 96; 51-63.

Sadleir, KR; Vassar, R. Cdk5 Protein Inhibition and A β 42 Increase BACE1 Protein Level in Primary Neurons by a Post-transcriptional Mechanism: IMPLICATIONS OF CDK5 AS A THERAPEUTIC TARGET FOR ALZHEIMER DISEASE. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012. 287; (10): 7224-35.

Sahly, H; Podschun, R. Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997. 4; (4): 393-9.

Scaffidi, P; Misteli, T; Bianchi, ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002. 418; (6894): 191-5.

Sellner, J; Tauber, MG; Leib, SL. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections. *Handb Clin Neurol*. 2010. 96; 1-16.

Seo, JH; Guo, S; Lok, J; Navaratna, D; Whalen, MJ; Kim, K-W; Lo, EH. Neurovascular Matrix Metalloproteinases and the Blood-Brain Barrier. *Current pharmaceutical design*. 2012. 18; (25): 3645-48.

Seo, KH; Choi, JW. The Effects of Remifentanyl on Expression of High Mobility Group Box 1 in Septic Rats. 2017. 32; (3): 542-51.

Shibata, M; Yamada, S; Kumar, SR; Calero, M; Bading, J; Frangione, B; Holtzman, DM; Miller, CA; Strickland, DK; Ghiso, J; Zlokovic, BV.

Clearance of Alzheimer's amyloid- β (1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *Journal of Clinical Investigation*. 2000. 106; (12): 1489-99.

Sims, GP; Rowe, DC; Rietdijk, ST; Herbst, R; Coyle, AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010. 28; 367-88.

Sultana, R; Butterfield, DA. Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010. 19; (1): 341-53.

Takami, M; Funamoto, S. gamma-Secretase-Dependent Proteolysis of Transmembrane Domain of Amyloid Precursor Protein: Successive Tri- and Tetrapeptide Release in Amyloid beta-Protein Production. *Int J Alzheimers Dis*. 2012. 2012; 591392.

Takuma, K; Fang, F; Zhang, W; Yan, S; Fukuzaki, E; Du, H; Sosunov, A; Mckhann, G; Funatsu, Y; Nakamichi, N; Nagai, T; Mizoguchi, H; Ibi, D; Hori, O; Ogawa, S; Stern, DM; Yamada, K; Yan, SS. RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-beta and neuronal dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. 106; (47): 20021-6.

Tamagno, E; Bardini, P; Guglielmotto, M; Danni, O; Tabaton, M. The various aggregation states of beta-amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. *Free Radic Biol Med*. 2006. 41; (2): 202-12.

Tamagno, E; Guglielmotto, M; Aragno, M; Borghi, R; Autelli, R; Giliberto, L; Muraca, G; Danni, O; Zhu, X; Smith, MA; Perry, G; Jo, D-G; Mattson, MP; Tabaton, M. Oxidative stress activates a positive feedback between the γ - and β -secretase cleavages of the β -amyloid precursor protein. *Journal of neurochemistry*. 2008. 104; (3): 683-95.

Tanaka, N; Yonekura, H; Yamagishi, S; Fujimori, H; Yamamoto, Y; Yamamoto, H. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000. 275; (33): 25781-90.

Tanaka, S; Nakamura, S; Ueda, K; Kameyama, M; Shiojiri, S; Takahashi, Y; Kitaguchi, N; Ito, H. Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988. 157; (2): 472-9.

Tang, LM; Chen, ST; Hsu, WC; Lyu, RK. Acute bacterial meningitis in adults: a hospital-based epidemiological study. *QJM.* 1999. 92; (12): 719-25.

Tauber, MG; Moser, B. Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications. *Clin Infect Dis.* 1999. 28; (1): 1-11; quiz 12.

Thigpen, MC; Whitney, CG; Messonnier, NE; Zell, ER; Lynfield, R; Hadler, JL; Harrison, LH; Farley, MM; Reingold, A; Bennett, NM; Craig, AS; Schaffner, W; Thomas, A; Lewis, MM; Scallan, E; Schuchat, A. Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. *N Engl J Med.* 2011. 364; (21): 2016-25.

Tibbling, G; Link, H; Ohman, S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest.* 1977. 37; (5): 385-90.

Tillement, JP; Lecanu, L; Papadopoulos, V. Amyloidosis and neurodegenerative diseases: current treatments and new pharmacological options. *Pharmacology.* 2010. 85; (1): 1-17.

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

Ueno, H; Matsuda, T; Hashimoto, S; Amaya, F; Kitamura, Y; Tanaka, M; Kobayashi, A; Maruyama, I; Yamada, S; Hasegawa, N; Soejima, J; Koh, H; Ishizaka, A. Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004. 170; (12): 1310-6.

Van De Beek, D. Corticosteroids for acute adult bacterial meningitis. *Med Mal Infect.* 2009. 39; (7-8): 531-8.

Van De Beek, D; De Gans, J; Tunkel, AR; Wijdicks, EF. Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med.* 2006. 354; (1): 44-53.

Van Furth, AM; Roord, JJ; Van Furth, R. Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy. *Infect Immun.* 1996. 64; (12): 4883-90.

Van Zoelen, MA; Achouiti, A; Van Der Poll, T. The role of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in infection. *Crit Care.* 2011. 15; (2): 208.

Waage, A; Halstensen, A; Shalaby, R; Brandtzaeg, P; Kierulf, P; Espevik, T. Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med.* 1989. 170; (6): 1859-67.

Waites, CL; Garner, CC. Presynaptic function in health and disease. *Trends Neurosci.* 2011. 34; (6): 326-37.

Wang, CY; Xie, JW; Xu, Y; Wang, T; Cai, JH; Wang, X; Zhao, BL; An, L; Wang, ZY. Trientine reduces BACE1 activity and mitigates amyloidosis via the AGE/RAGE/NF-kappaB pathway in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2013. 19; (17): 2024-39.

Wang, H; Bloom, O; Zhang, M; Vishnubakat, JM; Ombrellino, M; Che, J; Frazier, A; Yang, H; Ivanova, S; Borovikova, L; Manogue, KR; Faist, E; Abraham, E; Andersson, J; Andersson, U; Molina, PE; Abumrad, NN; Sama, A; Tracey, KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* 1999. 285; (5425): 248-51.

Weiss, N; Miller, F; Cazaubon, S; Couraud, PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2009. 1788; (4): 842-57.

Wilkins, HM; Swerdlow, RH. Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull.* 2016.

Wuwongse, S; Cheng, SS; Wong, GT; Hung, CH; Zhang, NQ; Ho, YS; Law, AC; Chang, RC. Effects of corticosterone and amyloid-beta on

proteins essential for synaptic function: implications for depression and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013. 1832; (12): 2245-56.

Xie, J; Reverdatto, S; Frolov, A; Hoffmann, R; Burz, DS; Shekhtman, A. Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem*. 2008. 283; (40): 27255-69.

Xie, Y; Tan, Y; Chongsuvivatwong, V; Wu, X; Bi, F; Hadler, SC; Jiraphongsa, C; Sornsrivichai, V; Lin, M; Quan, Y. A Population-Based Acute Meningitis and Encephalitis Syndromes Surveillance in Guangxi, China, May 2007- June 2012. *PLoS One*. 2015. 10; (12): e0144366.

Yirmiya, R; Goshen, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun*. 2011. 25; (2): 181-213.

Zhang, J; Zhen, YF; Pu Bu Ci, R; Song, LG; Kong, WN; Shao, TM; Li, X; Chai, XQ. Salidroside attenuates beta amyloid-induced cognitive deficits via modulating oxidative stress and inflammatory mediators in rat hippocampus. *Behav Brain Res*. 2013. 244; 70-81.

Zhang, YW; Thompson, R; Zhang, H; Xu, H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2011. 4; 3.

Zong, H; Madden, A; Ward, M; Mooney, MH; Elliott, CT; Stitt, AW. Homodimerization is essential for the receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated signal transduction. *J Biol Chem*. 2010. 285; (30): 23137-46.

ANEXO



**Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Papel da via β -amilóide-RAGE na disfunção cognitiva tardia na meningite bacteriana”**, **Protocolo nº 021/2015-2** sob a responsabilidade de **Josiane Budni** equipe: Amanda Valnier Steckert, Jaqueline S. Generoso, Lutiana R. Simões, Ana Paula Moreira, Diogo Domingui, Débora B. Tomaz, Jéssica A. Goularte, Cássia P. Rafael, Cristiano Julio Faller, Gustavo Sangiogo da Silva, Monique Michels, Felipe Dal Pizzol, Tatiana Barichello e João Luciano de Quevedo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Vigência do Projeto	03/09/2015 a 20/12/2016
Espécie/linhagem	Ratos Wistar
Nº. De animais	158
Peso/Idade	60 dias
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 021/2015-2


Principal Investigator: Josiane Budni.

Researchers: Amanda Valnier Steckert, Jaqueline S. Generoso, Lutiana R. Simões, Ana Paula Moreira, Diogo Domingui, Débora B. Tomaz, Jéssica A. Goularte, Cássia P. Rafael, Cristiano Julio Faller, Gustavo Sangiogo da Silva, Monique Michels, Felipe Dal Pizzol, Tatiana Barichello e João Luciano de Quevedo.

Project title: *Role of β -amyloid-RAGE pathway in the late cognitive impairment in bacterial 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@unesc.net.

Criciúma, 08 de setembro de 2015.


JAIRO JOSÉ ZOCCHE
 Coordenador da CEUA