

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

**IVONETE DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS  
E COMPORTAMENTO SEMELHANTE À DEPRESSÃO EM RATOS  
*WISTAR* ADULTOS INDUZIDOS À MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

**CRICIÚMA, JULHO DE 2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**IVONETE DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS  
E COMPORTAMENTO SEMELHANTE À DEPRESSÃO EM RATOS  
*Wistar* ADULTOS INDUZIDOS À MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tatiana Barichello

**CRICIÚMA, JULHO DE 2010**

**IVONETE DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS  
E COMPORTAMENTO SEMELHANTE À DEPRESSÃO EM RATOS  
*WISTAR* ADULTOS INDUZIDOS À MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Presidente: Prof(a). Tatiana Barichello, Dr<sup>a</sup> - Orientadora, UNESC

---

Membro: Prof(a). ....., Dr. - UNESC

---

Membro: Prof(a). ....., Dr. - UNESC

---

Membro: Prof(a). ....., Dr. - UNESC

---

Membro: Prof(a). ....., Dr. - UNESC

Dedico ao meu companheiro, Carol, e à minha filha, Graziela, que compreenderam sempre e reforçaram a importância desta etapa em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me guiou e iluminou para que eu pudesse chegar até aqui, infundindo-me coragem e fé, para continuar a caminhada por um mundo mais humano, mais equitativo, onde o mais importante é a dignidade e o respeito à vida.

Ao meu marido Carol e à minha filha Graziela, pela companhia, amor, incentivo e compreensão pela minha ausência, motivada pelos compromissos acadêmicos.

Aos meus colegas de laboratório, Tiago Silvestre, Cíntia Silvestre, Andreza L. Cipriano, Geovana D. Savi, Gustavo Feier, professora Cleonice M. Michelin, Mariane T. Pezente e em especial à Jaqueline da S. Generoso pela disponibilidade, carinho, dedicação em ajudar.

À minha querida orientadora, professora Tatiana Barichello, pela dedicação, carinho, esperança e humildade e por ter recebido meu trabalho de forma profissional e materna.

A todos os professores que transmitiram conhecimentos e experiências, despertando cada vez mais o senso crítico para ações criativas e inovadoras.

Aos meus colegas do curso de Doutorado, que também contribuíram para o meu crescimento, por meio das idéias e experiências trazidas às discussões em sala de aula.

## Tente Outra Vez

Raul Seixas

Veja!  
Não diga que a canção  
Está perdida  
Tenha em fé em Deus  
Tenha fé na vida  
Tente outra vez!...

Beba! (Beba!)  
Pois a água viva  
Ainda tá na fonte  
(Tente outra vez!)  
Você tem dois pés  
Para cruzar a ponte  
Nada acabou!  
Não! Não! Não!...

Oh! Oh! Oh! Oh!  
Tente!  
Levante sua mão sedenta  
E recomece a andar  
Não pense  
Que a cabeça agüenta  
Se você parar  
Não! Não! Não!  
Não! Não! Não!...

Há uma voz que canta  
Uma voz que dança  
Uma voz que gira  
(Gira!)  
Bailando no ar  
Uh! Uh! Uh!...

Queira! (Queira!)  
Basta ser sincero  
E desejar profundo  
Você será capaz  
De sacudir o mundo  
Vai!  
Tente outra vez!  
Humrum!...

Tente! (Tente!)  
E não diga  
Que a vitória está perdida  
Se é de batalhas  
Que se vive a vida  
Han!  
Tente outra vez!...

## RESUMO

A meningite bacteriana causada por *Streptococcus pneumoniae* está associada a uma alta taxa de mortalidade e sequelas neurológicas persistentes, incluindo déficit sensorio-motor, convulsões, prejuízo de aprendizagem e memória. A proliferação do microrganismo no espaço subaracnóideo e ventricular desencadeia uma resposta inflamatória intensa, na tentativa de eliminar o microrganismo invasor. Mediadores pró-inflamatórios liberados no processo inflamatório incluem o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6 e CINC-1 e sintomas semelhantes à depressão em ratos Wistar induzidos à meningite pneumocócica. Os animais foram submetidos à inoculação na cisterna magna e receberam 10  $\mu$ L de soro fisiológico estéril no grupo controle ou um volume equivalente de uma suspensão de *S. pneumoniae* na concentração  $5 \times 10^9$  UFC/mL. Os animais foram sacrificados em diferentes tempos: 0, 6, 12, 24, 48 e 96 horas após a inoculação para dosagem dos níveis de mediadores pró-inflamatórios em estruturas cerebrais. Em outro estudo, dez dias após a indução, foi utilizado o teste de nado forçado para avaliação do comportamento semelhante à depressão e dosagem dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6 e CINC-1. No hipocampo, houve aumento dos níveis do TNF- $\alpha$  em 6 horas; os níveis de CINC-1 foram aumentados em 6, 12 e 24 horas e, nos níveis de IL-1  $\beta$  e IL-6, não houve alterações. No córtex pré-frontal, os níveis de TNF- $\alpha$  foram aumentados apenas 6 horas após a indução e, no que se refere a IL-1 $\beta$  e IL-6, os níveis foram aumentados apenas em 24 horas após a indução da meningite. Em CINC-1, foram encontrados níveis aumentados em 6, 12 e 24 horas após a indução à meningite. No teste de nado forçado realizado 10 dias após a indução da meningite, foi observado um aumento significativo no tempo de imobilidade no grupo meningite em comparação ao grupo controle. O nível de TNF- $\alpha$  aumentou no córtex pré-frontal, mas não no hipocampo. Os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e CINC-1 não apresentaram alterações no córtex pré-frontal e no hipocampo 10 dias após a indução da meningite pelo *S. pneumoniae*. Os dados sugerem que os níveis de citocinas e quimiocinas podem ser possíveis biomarcadores de danos cerebrais nas primeiras horas da meningite pneumocócica, sendo esse modelo uma boa ferramenta de pesquisa para o estudo dos mecanismos biológicos envolvidos nas alterações comportamentais da meningite pneumocócica.

**Palavras-chave:** *Streptococcus pneumoniae*, meningite, citocinas, quimiocinas, depressão.



## ABSTRACT

Bacterial meningitis due to *Streptococcus pneumoniae* is associated with a significant mortality rate and persisting neurologic sequelae including sensory-motor deficits, seizures, and impairments of learning and memory. The presence of proliferating bacteria within the subarachnoid and ventricular space compartments triggers an intense inflammatory host response to kill the invading microorganism. Proinflammatory mediators released in the process include tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, and all of which have been shown to contribute to the development of brain injury in bacterial meningitis. Thus, the aim of this study was to verify the levels of the TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CINC-1 in the rat brain and depressive-like behavior after pneumococcal meningitis. The animals underwent a magna cistern tap receiving either 10  $\mu$ L sterile saline as a placebo or an equivalent volume of a *S. pneumoniae* suspension at the concentration  $5 \times 10^9$  cfu/mL. The animals were killed at 0, 6, 12, 24, 48, 96 h and ten days after induction we evaluated depressive-like behavior by using the forced swimming test and verified the levels of the TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and CINC-1. In the hippocampus we found increased levels of the TNF- $\alpha$  only at 6 hours; the CINC-1 increased levels at 6, 12 e 24 hours and the IL-6 and IL-1 $\beta$  levels there was no alteration. In the frontal cortex, the TNF- $\alpha$  levels were found increased only at 6 hours, the IL-1 $\beta$  and IL-6 the levels were found increased only at 24 hours after meningitis induction. The CINC-1 levels were found increased at 6, 12 and 24 hours after meningitis induction. In the forced swimming test, 10 days after meningitis induction we observed a significant increase in the immobility time in the meningitis group compared to the sham group. The TNF- $\alpha$  levels were found increased in the prefrontal cortex, but not in the hippocampus. On the other hand, we did not find any alteration in IL-1 $\beta$ , IL-6 and CINC-1 levels in prefrontal cortex and hippocampus 10 days after meningitis induction by *S. pneumoniae*. Our data suggest that cytokine/chemokine levels can be putative biomarkers of brain damage in the first hours of the pneumococcal meningitis and the meningitis animal model may be a good research tool for the study of the biological mechanisms involved in the behavioral alterations secondary to pneumococcal meningitis.

**Key-words:** *Streptococcus pneumoniae*, meningitis, cytokine, chemokine, behavior.

## LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

BHC - Barreira Hematoencefálica

CINC - Citocina Quimiotática Indutora de Neutrófilos

DNA - Ácido Desoxirribonucléico - *Deoxyribonucleic Acid*

TNF - Tumor Necrosis Factor

HSV - Vírus Herpes Simples

IL - Interleucina

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

MMP - Metaloproteinase

NF - Nuclear Factor

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAF – Platelet- activating-factor

SNC - Sistema Nervoso Central

UFC - Unidade Formadora de Colônias

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
1.1	Meningite .....	10
1.2	Epidemiologia .....	11
1.3	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	13
1.4	Fisiopatologia .....	14
1.5	Citocinas e Quimiocinas .....	16
1.6	Depressão .....	18
1.7	Modelo Animal de Meningite .....	19
2	OBJETIVOS .....	21
2.1	Objetivo geral.....	21
2.2	Objetivos específicos.....	21
3	RESULTADOS .....	22
3.1	Artigo 1: <i>Tumor necrosis factor alpha (TNF-<math>\alpha</math>) levels in the brain and cerebrospinal fluid after meningitis induced by Streptococcus pneumoniae</i> ....	24
3.2	Artigo 2: <i>TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6, and CINC-1 levels in rat brain after meningitis induced by Streptococcus pneumoniae</i> .....	29
3.3	Artigo 3: <i>Depressive-like-behavior and proinflammatory interleukine levels in the brain of rats submitted to pneumococcal meningitis</i> .....	34
4	DISCUSSÃO .....	39
	REFERÊNCIAS.....	44

## 1 INTRODUÇÃO

Este capítulo discorre sobre questões referentes ao tema desta tese – Avaliação dos níveis de mediadores pró-inflamatórios e comportamento semelhante à depressão em ratos Wistar adultos induzidos à meningite pneumocócica –, além de apresentar os objetivos da pesquisa realizada. Assim, temos, na sequência, uma abordagem sobre meningite, epidemiologia, *Streptococcus pneumoniae*, fisiopatologia, citocinas e quimiocinas, depressão, modelo animal de meningite, o objetivo geral e os objetivos específicos.

### 1.1 Meningite

As infecções do Sistema Nervoso Central (SNC) estão entre as doenças mais debilitantes do século XXI em todo o mundo (WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004; KIM, 2008). A meningite bacteriana é uma inflamação das meninges que afeta a piamáter, a aracnóide e o espaço subaracnóideo (KIM, 2010). Entretanto, a mortalidade e a morbidade variam de acordo com a idade – incluindo recém-nascidos –, com o microrganismo infectante e com a localização geográfica, principalmente em indivíduos que vivem em países subdesenvolvidos (KLINGER *et al.*, 2000; KIM, 2003; 2010). A infecção aguda mais severa do SNC é a meningite ocasionada pelo *Streptococcus pneumoniae* (MOLYNEUX *et al.*, 2002; DE GANS, VAN DE BEEK, 2002; BRANDT, 2010).

A meningite causa danos que afetam múltiplas áreas do cérebro com uma distribuição heterogênea e em diferentes tempos (KIM *et al.*, 1995). A falta de uniformidade nos danos ocorridos gera uma dificuldade para avaliar a severidade e

o grau dos danos neuronais (IRAZUZTA *et al.*, 2000). Isso dificulta quantificar os danos cerebrais, especialmente em períodos imediatamente após a lesão, o que cria obstáculos nas novas terapias (IRAZUZTA *et al.*, 2001).

O SNC difere, na resposta inflamatória, em relação a outros tecidos. A infiltração celular no cérebro em resposta à inflamação, à infecção e ao dano pode ser fraca e lenta, mas, muitas vezes, essa resposta pode ser induzida rapidamente. A resposta rápida inclui ativação da microglia, liberação de proteínas de fase aguda, complemento e citocinas (ALLAN; ROTHWELL, 2001). O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 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).

## 1.2 Epidemiologia

No mundo, a incidência anual da meningite bacteriana é aproximadamente de 1,2 milhões de casos, ocorrendo 135 mil mortes por ano (KLEIN *et al.*, 2006).

A mortalidade por meningite pneumocócica pode variar, ocorrendo em torno de 15% em países industrializados e até 40% em países em desenvolvimento (DE GANS; VAN DE BEEK, 2002; MOLYNEUX *et al.*, 2002; BRANDT, 2010). Aproximadamente 50% dos sobreviventes apresentam sequelas, incluindo prejuízo de aprendizagem, memória temporária e perda auditiva – com possibilidade de ocasionar surdez –, retardo mental e hidrocefalia (WALD *et al.*, 1995; MERKELBACH *et al.*, 2000; BRANDT, 2010).

Os agentes da meningite bacteriana, comumente encontrados nos Estados Unidos e no norte da Europa, incluem *S. pneumoniae*, cuja incidência varia entre 47 e 51%; *Neisseria meningitidis*, variando entre 25 e 37%; e *Listeria monocytogenes*, com variação entre 4 e 8% dos casos (HONDA; WARREN, 2009).

Nos Estados Unidos, a incidência anual de meningite bacteriana é de 3 a 6 casos por 100.000 habitantes (CHOIC, 2001; WEISFELT *et al.*, 2006; HONDA; WARREN, 2009); na França, é de 2,23 casos por 100.000 habitantes (VARON, 2009); na República Tcheca, a meningite pneumocócica variou entre 0,4 e 0,6 casos por 100.000 habitantes, entre os anos de 1997 e 2006 (MOTLOVA *et al.*, 2009).

Na África subsaariana, aproximadamente 430 milhões de pessoas vivem na área conhecida como cinturão da meningite, que se estende do Senegal até a Etiópia. Mesmo utilizando tratamento adequado com antimicrobianos, cerca de 10% dos pacientes morrem e até 20% ficam com sequelas definitivas, como perda auditiva e danos cerebrais (WHO, 2008, *site*).

No Brasil, cuja população é de 192.879.731 habitantes, segundo estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), houve uma incidência anual de 10,22 casos por 100.000 habitantes no ano de 2009, sendo que o estado de São Paulo teve incidência de 19,93 por 100.000 habitantes. Entre as capitais, Manaus teve 7,01 de incidência; Teresina, 64,18; São Paulo, 25,58; Campo Grande, 30,7; e Porto Alegre, 30,7. O estado de Santa Catarina teve 14,76 casos e suas cidades mais populosas apresentaram a seguinte incidência: Joinville, 19,33; Florianópolis, 21,05; Blumenau, 12,80; Criciúma, 86,25; Chapecó, 2,57, todos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2009).

Em Salvador, a terceira maior cidade do Brasil, mais de 80% dos indivíduos acometidos por meningite bacteriana residem em favelas. A incidência

anual da meningite pneumocócica é de 31,7 casos por 100.000 habitantes por ano, com faixa etária entre 1 e 5 anos (KO *et al.*, 2000; REIS *et al.*, 2008).

### 1.3 *Streptococcus pneumoniae*

O *S. pneumoniae* possui vários mecanismos de patogenezidade, entre eles cápsula de polissacarídeo, pneumolisina, hialuronidase, lipoproteínas e proteínas de superfície (MITCHELL; MITCHELL, 2010).

A cápsula de polissacarídeo é, provavelmente, o fator mais importante de virulência do pneumococo. Na virulência, o papel da cápsula decorre de sua atividade antifagocitária. A presença da cápsula impede a célula bacteriana de interagir com os receptores das células fagocitárias, permanecendo o microrganismo extracelular, facilitando também a colonização, reduzindo a exposição do microrganismo ao antimicrobiano (NELSON *et al.*, 2007; VAN DER POLL *et al.*, 2009; MITCHELL; MITCHELL, 2010)

A pneumolisina, maior exotoxina do *S. pneumoniae*, possui propriedades citotóxicas e pró-inflamatórias e é um importante determinante da virulência pneumocócica. Os efeitos pró-inflamatórios da pneumolisina incluem ativação do complemento, recrutamento de neutrófilos, aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , interleucina IL-1 $\beta$ , óxido nítrico (PATON, 1996; BRAUN *et al.*, 1999; BRAUN *et al.*, 2007) e ativação da resposta imune através do receptor Toll-like-4 (SRIVASTAVA *et al.*, 2005; BRAUN *et al.*, 2007). A pneumolisina ocasiona a morte celular neuronal através do dano na membrana mitocondrial. Uma potencial estratégia para reduzir o dano celular causado pelo *S. pneumoniae* é neutralizar essa toxina (BRAUN *et al.*, 2007).

A hialuronidase é uma enzima que rompe o ácido hialurônico que, por sua vez, é um componente conectivo dos tecidos dos mamíferos. A degradação pode ajudar a propagação e a colonização do microrganismo, potencializado, principalmente, na pneumonia pneumocócica através da interação com citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são capazes de induzir a produção do ácido hialurônico pelos fibroblastos (IRWIN *et al.*, 1994; MITCHELL; MITCHELL 2010).

A neuraminidase cliva o ácido N-acetilneuramínico de glicolípídeos, lipoproteínas e oligossacarídeos nas superfícies das células e em fluidos corporais. Esse mecanismo de patogenezidade pode causar danos diretos ao hospedeiro. A perda de ácido siálico devido à atividade da neuraminidase facilita o avanço do pneumococo para a tuba de Eustáquio até o ouvido médio (LINDER *et al.*, 1994; MITCHELL; MITCHELL, 2010).

#### **1.4 Fisiopatologia**

O pneumococo coloniza a mucosa da superfície do trato respiratório superior, sendo a colonização desse sítio aparentemente assintomática. A rota de propagação do pneumococo no SNC ainda não foi totalmente elucidada. Focos, como otite média, sinusite, pneumonia e bacteremia, parecem ser os percursos evidentes (OSTERGAARD, 2005; OSTERGAARD *et al.*, 2005; BRANDT, 2010).

O *S. pneumoniae* atravessa a barreira hematoencefálica (BHE), que é uma estrutura funcional do cérebro formada por células endoteliais microvasculares, astrócitos e pericitos, responsáveis pela manutenção do microambiente neuronal através da regulação da passagem de moléculas de dentro para fora do cérebro,



protegendo-o de microrganismos e toxinas presentes na corrente sanguínea (KIM *et al.*, 2004; KIM, 2008). O pneumococo atravessa a barreira hematoencefálica através da ligação, na parede celular, com a fosforilcolina e com o receptor do fator ativador de plaquetas. Esse patógeno utiliza o mecanismo de passagem transcelular sem evidência alguma de dano na junção intercelular ou detecção do microrganismo entre as células (KIM, 2003, 2006, 2008).

Quando o microrganismo invade o SNC, replica-se rapidamente e, ao mesmo tempo, ocorre lise bacteriana que leva à liberação de componentes, como polissacarídeo, ácido teicóico e peptidoglicano, os quais estimulam a liberação de moléculas neuroinflamatórias e outras proteínas pró-inflamatórias do hospedeiro (WAGGENER, 1974; VAN DE BEEK, 2009). Com isso, ocorre o aumento de leucócitos, predominantemente neutrófilos e granulócitos, no espaço subaracnóideo (BRANDT, 2010), e aumento da permeabilidade da BHC e do fluxo sanguíneo cerebral, resultando em acúmulo de líquido devido ao extravasamento dos constituintes plasmáticos, o que leva ao desenvolvimento de edema cerebral, indicando que esse mecanismo pode ser a causa do aumento da pressão intracraniana e do comprometimento cerebral. Além disso, a resposta preliminar do hospedeiro em reconhecimento ao patógeno e à produção de citocinas continua sendo intensamente investigada com a finalidade de identificar benefícios e consequências dessa resposta do hospedeiro (BRANDT, 2010).

A investigação macroscópica em autopsias realizadas em pacientes que morreram de meningite pneumocócica revelou secreção purulenta e camadas fibrinosas recobrando a superfície cerebral (QUAAD; KRISTENSEN, 1962; BRANDT, 2010). O estudo microscópico foi caracterizado por necrose tecidual nos hemisférios corticais e pela apoptose no giro denteado de células hipocampais (NAU *et al.*,

1999). A apoptose neuronal no hipocampo está associada à disfunção da memória e da aprendizagem em sobreviventes de meningite (NAU *et al.*, 1999; BRANDT, 2010).

## 1.5 Citocinas e Quimiocinas

O sistema imune é altamente integrado com outros sistemas fisiológicos e biológicos (TEELING; PERRY, 2009). A comunicação bidirecional entre o sistema imune e o SNC possibilita interação entre o cérebro e a resposta imune, sendo que essa resposta também pode estar envolvida em processos neuropatológicos (MILLER *et al.*, 1999).

As citocinas compõem um grupo heterogêneo de mensageiros moleculares que são produzidos pelas células, como linfócitos e macrófagos, com a finalidade de regulamentar as respostas imunes. Apesar de suas especificidades biológicas, suas atividades podem variar em duas categorias gerais de citocinas, as quais podem ser distinguidas em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. As pró-inflamatórias são compostas por citocinas que estão envolvidas direta ou indiretamente no processo inflamatório, como a IL-1 $\beta$ , IL-6, interferon e TNF- $\alpha$ . As anti-inflamatórias são conhecidas por diminuir a resposta imune, contrariando a ativação celular, bem como a produção de mediadores pró-inflamatórios. Esse grupo inclui a IL-4, a IL-10 e a IL-13 (JANEWAY; TRAVERS, 1997).

Em condições patológicas, tais como inflamações agudas, crônicas ou dano tecidual, o sistema imune é ativado e ocorre um aumento da produção de macrófagos, liberação de citocinas, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (JANEWAY; TRAVERS, 1997) e seus receptores têm sido produzidos pelo próprio SNC,

principalmente pelos astrócitos e microglia. Em certas condições, alguns neurônios também são capazes de liberar citocinas (FREIDIN *et al.*, 1992).

As citocinas produzidas têm sido encontradas em diferentes locais do SNC, incluindo hipotálamo, hipocampo, cerebelo, região circunventricular, gânglios basais, núcleos do tronco cerebral e regiões do prosencéfalo (BREDEK *et al.*, 1988).

Após a interação entre o microrganismo e o hospedeiro, ocorre a resposta defensiva que envolve tanto componentes do sistema imune humoral como o celular. As células mononucleares desempenham um papel fundamental liberando as clássicas citocinas pró-inflamatórias – IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  - além de outra variedade de interleucinas, incluindo a IL-12, IL-15, IL-18, e uma série de outras moléculas, como quimiocinas, mediadores lipídicos como fator ativador de plaquetas, prostaglandinas, leucotrienos, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (CHOI; FRIEDMAN, 2009).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina composta por 157 aminoácidos e produzida em resposta às lesões inflamatórias, infecciosas ou estimulada por macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células estruturais, tais como fibroblastos, células musculares lisas (BALAKUMAR; SINGH, 2006), astrócitos e microglia (KRONFOL; REMICK, 2000). O TNF- $\alpha$  é considerado uma molécula pró-inflamatória que aumenta a resposta imune para acelerar a eliminação do patógeno e uma melhor eficácia do processo inflamatório. O TNF- $\alpha$  tem vários efeitos, incluindo citotoxicidade, atividade antiviral e ativação do fator de transcrição e regulação da resposta imune (BHARDWAJ; AGGARWAL, 2003). O TNF- $\alpha$  exerce efeitos através da ligação com receptores específicos denominados TNF-R1 e TNF-R2 (GOSSELIN; RIVEST, 2007). O TNF-R1 é mais abundante e existe na maioria dos tecidos e tipos celulares, além de parecer ser o principal receptor de sinalização. A maioria dos efeitos

deletérios ocasionados pelo TNF- $\alpha$  parece ser mediada por esse receptor. O TNF-R1 medeia muitas ações do TNF- $\alpha$ , incluindo a produção de citocinas, ativação do fator de transcrição NF-Kb e apoptose. Curiosamente, a ativação do TNF-R1 pode desencadear uma dupla cascata de sinalização que, em diferentes tipos celulares, pode levar à apoptose, proliferação, diferenciação ou sobrevivência. Em neurônios e microglia, TNF- $\alpha$  induz apoptose quando se liga ao receptor TNF-R1 (BRIETZKE; KAPCZINSKI, 2008)

A IL-1 $\beta$  tem várias funções neuroinflamatórias, em particular a IL-1 $\beta$  é conhecida por induzir a produção de outras interleucinas e fator de crescimento, afetando a resposta neuroendócrina e a atividade do sistema hipotalâmico pituitário adrenal, exercendo direta influência sobre a neurodegeneração, sendo que a inibição da IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  evita dano neuronal ocasionado pela isquemia cerebral. Além dos efeitos neurodegenerativos, a IL-1 $\beta$  afeta a remielinização pelos oligodendrócitos após a lesão (CHOI; FRIEDMAN, 2009).

A IL-1 $\beta$  é uma potente citocina que guia a resposta inflamatória de fase aguda e tem um papel essencial na resposta imune inata. Altos níveis de IL-1 $\beta$  têm sido implicados em doenças inflamatórias, incluindo diabetes tipo 2.

Pacientes com meningite pneumocócica podem liberar no SNC citocinas, particularmente IL-6 e TNF- $\alpha$ , as quais contribuem para sua elevação no plasma, o que é essencial para o desenvolvimento da sepse (KIRSTEN *et al.*, 2005).

## 1.6 Depressão

A depressão é uma crescente preocupação mundial de saúde pública (JOHNSON *et al.*, 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a

depressão é um transtorno mental comum, caracterizado por tristeza, perda de interesse ou prazer e de apetite, sentimentos de culpa ou baixa autoestima, sono perturbado, baixa energia e baixa concentração (OMS, 2010, *site*). Doenças infecciosas do SNC podem ocasionar, direta ou indiretamente, sintomas neuropsiquiátricos (BRIETZKE; KAPCZINSKI, 2008). Os transtornos psiquiátricos têm relatado modificações das funções da atividade do sistema imune, principalmente na depressão maior. O desequilíbrio das funções da atividade do sistema imune em depressão é um fenômeno que tem sido demonstrado inúmeras vezes (KRONFOL *et al.*, 1983). Existem alguns estudos que descrevem um potencial papel das citocinas na patogênese da depressão. Pacientes com depressão que são saudáveis parecem ter ativado vias inflamatórias, levando a um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, bem como com o aumento da expressão de quimiocinas e moléculas de adesão (RAISON *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007; BRIETZKE; KAPCZINSKI, 2008). De acordo com esses conceitos, a depressão maior pode ser considerada um transtorno psiconeuroimunológico através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, sendo responsáveis por uma modificação de comportamento, alterações neuroendócrinas e neuroquímicas que estão associadas a condições psiquiátricas (LEONARD, 2001).

### **1.7 Modelo Animal de Meningite**

O modelo animal de meningite utilizando ratos é extremamente versátil e permite refinada avaliação clínica e neurológica dos sintomas devido à tranquila manipulação desses animais. A avaliação da habilidade de aprendizagem em ratos pode ser utilizada em estudos posteriores à indução da meningite para verificar os

prejuízos cognitivos (LEIB *et al.*, 2001). Outras vantagens desse modelo incluem a inoculação da meningite e a amostragem. Grandgirard *et al.* (2007a) identificaram morte celular por apoptose no giro denteado hipocampal de ratos jovens. Dano hipocampal semelhante foi verificado em humanos que morreram devido à meningite (NAU, 1999). Esse modelo também é utilizado em estudos neurossensoriais associados à perda auditiva (KESSER *et al.*, 1999; KLEIN *et al.*, 2003) e a alterações na barreira hematoencefálica. Pressão intracraniana e edemas cerebrais também foram mensurados com sucesso nesse modelo (LORENZL *et al.*, 1996; PEDERSEN *et al.*, 2007; PEDERSEN *et al.*, 2008). Em nosso estudo, foram usados ratos Wistar adultos (250-300g) e machos, submetidos à meningite pneumocócica pela via intracisternal.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar os níveis de mediadores pró-inflamatórios e comportamento semelhante à depressão em ratos Wistar adultos induzidos à meningite pneumocócica.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar os níveis de TNF- $\alpha$  no hipocampo, córtex, córtex pré-frontal e líquido cefalorraquidiano nos tempos de 0, 6, 12, 24, 48 e 96 horas após a indução de meningite pneumocócica em ratos Wistar adultos.

Verificar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CINC-1 em ratos adultos submetidos a um modelo de meningite pneumocócica.

Analisar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CINC-1 no hipocampo, córtex e líquido cefalorraquidiano, 10 dias após a indução à meningite pneumocócica em ratos Wistar adultos.

Verificar os sintomas semelhantes à depressão, através do teste de nado forçado 10 dias após a indução da meningite pneumocócica em ratos Wistar adultos.

### 3 RESULTADOS

Dedicamos este capítulo à apresentação dos resultados obtidos com os estudos realizados.

Na seção 3.1, temos os resultados referentes à avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$  no hipocampo, córtex, córtex pré-frontal e líquido cefalorraquidiano nos tempos de 0, 6, 12, 24, 48 e 96 horas em ratos Wistar adultos induzidos à meningite pneumocócica, a qual se constitui no primeiro objetivo específico deste estudo.

Tais resultados se encontram expostos, nesta tese, com o título “Artigo 1”, haja vista que foram publicados, em dezembro de 2009, no periódico *Neuroscience Letters*, volume 467, edição 3, páginas 217-219, com estruturação de artigo intitulado *Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) levels in the brain and cerebrospinal fluid after meningitis induced by Streptococcus pneumoniae*.

Na seção 3.2, cujo título é “Artigo 2”, trazemos os resultados concernentes ao segundo objetivo específico, qual seja, avaliar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CINC-1 em ratos Wistar adultos induzidos à meningite pneumocócica. Esses resultados foram publicados, em abril de 2010, no *Journal of Neuroimmunology* – volume 221, edição 1, páginas 42-45 –, no formato de artigo, com o título *TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and CINC-1 levels in rat brain after meningitis induced by Streptococcus pneumoniae*.

A seção 3.3, a qual denominamos “Artigo 3”, expõe os resultados que obtivemos com a avaliação dos sintomas semelhantes à depressão, através do teste de nado forçado, em ratos Wistar adultos 10 dias após a indução da meningite pneumocócica, a qual se constituía como nosso quarto objetivo específico. Estruturamos os referidos resultados com o título *Depressive-like-behavior and*



*proinflammatory interleukine levels in the brain of rats submitted to pneumococcal meningitis*, com publicação no periódico *Brain Research Bulletin*, em maio de 2010.

### 3.1 Artigo 1

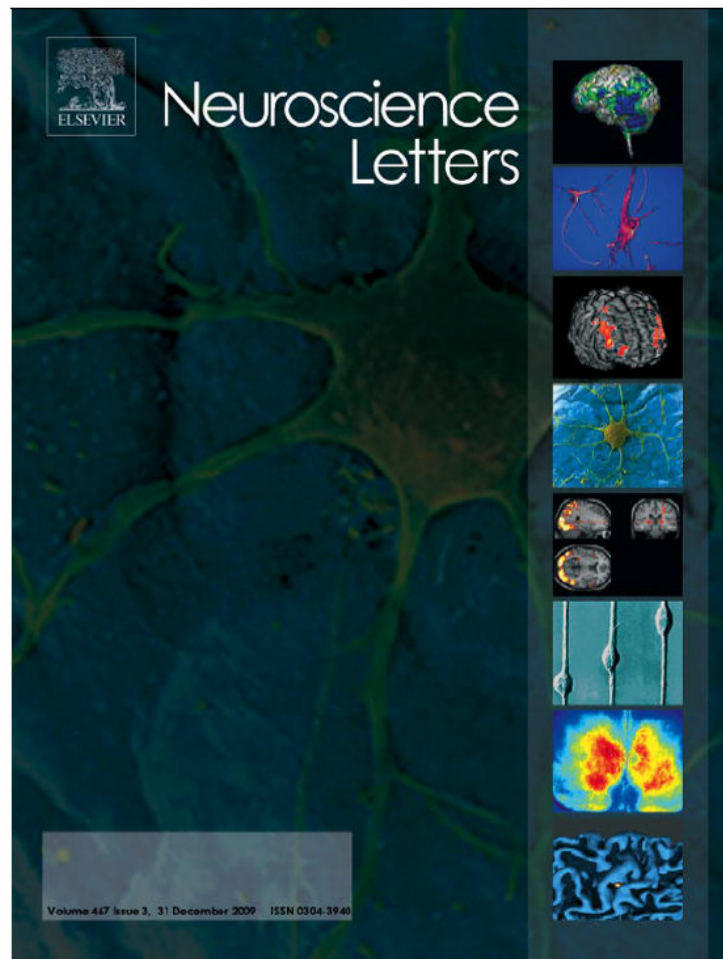
**Título:** *Tumor necrosis factor alpha (TNF-) levels in the brain and cerebrospinal fluid after meningitis induced by Streptococcus pneumoniae.*

**Autores:** Tatiana Barichello, Ivonete dos Santos, Geovana D. Savi, Anelise F. Florentino, Cintia Silvestre, Clarissa M. Comim, Gustavo Feier, Daniela Sachs, Mauro M. Teixeira, Antonio L. Teixeira, João Quevedo.

**Artigo publicado no periódico:** Neuroscience Letters 467 (2009) 217-219.<sup>1</sup>

---

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

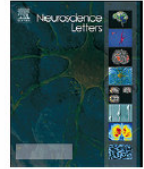
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neulet](http://www.elsevier.com/locate/neulet)

## Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) levels in the brain and cerebrospinal fluid after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*

Tatiana Barichello<sup>a,\*</sup>, Ivonete dos Santos<sup>a</sup>, Geovana D. Savi<sup>a</sup>, Anelise F. Florentino<sup>a</sup>, Cintia Silvestre<sup>a</sup>, Clarissa M. Comim<sup>b</sup>, Gustavo Feier<sup>b</sup>, Daniela Sachs<sup>c</sup>, Mauro M. Teixeira<sup>c</sup>, Antonio L. Teixeira<sup>c,d</sup>, João Quevedo<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Fisiopatologia Experimental and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Neurociências and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

<sup>c</sup> Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Básicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 September 2009

Received in revised form 6 October 2009

Accepted 9 October 2009

#### Keywords:

Meningitis

TNF- $\alpha$

*Streptococcus pneumoniae*

CNS

### ABSTRACT

Bacterial meningitis due to *Streptococcus pneumoniae* is associated with a significant mortality rate and persisting neurologic sequelae including sensory-motor deficits, seizures, and impairments of learning and memory. The presence of proliferating bacteria within the subarachnoid and ventricular space compartments triggers an intense inflammatory host response at killing the invading microorganism. Proinflammatory mediators released in the process include tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6. TNF- $\alpha$  have several effects, including cytotoxicity, antiviral activity, transcription factor activation, and immune response regulation. Thus, the aim of this study was to verify the levels of the TNF- $\alpha$  after pneumococcal meningitis in male Wistar rats. The animals underwent a magna cistern tap receiving either 10  $\mu$ L sterile saline as a placebo or an equivalent volume of a *S. pneumoniae* suspension at the concentration  $5 \times 10^9$  cfu/mL. The animals were killed at 0, 6, 12, 24, 48 and 96 h after induction. The brain was removed and hippocampus, cortex, prefrontal and cerebrospinal fluid (CSF) were isolated and used for the determination of TNF- $\alpha$  levels. We found an increase in TNF- $\alpha$  levels at 6 h after induction of the meningitis in the hippocampus ( $p < 0.01$ ), frontal cortex ( $p < 0.05$ ), and cerebrospinal fluid ( $p < 0.001$ ). There was no alteration in the cortex. Our data suggest that TNF- $\alpha$  is involved in the pathophysiology of the pneumococcal meningitis and could be investigated as a putative biomarker for brain damage in the first hours.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

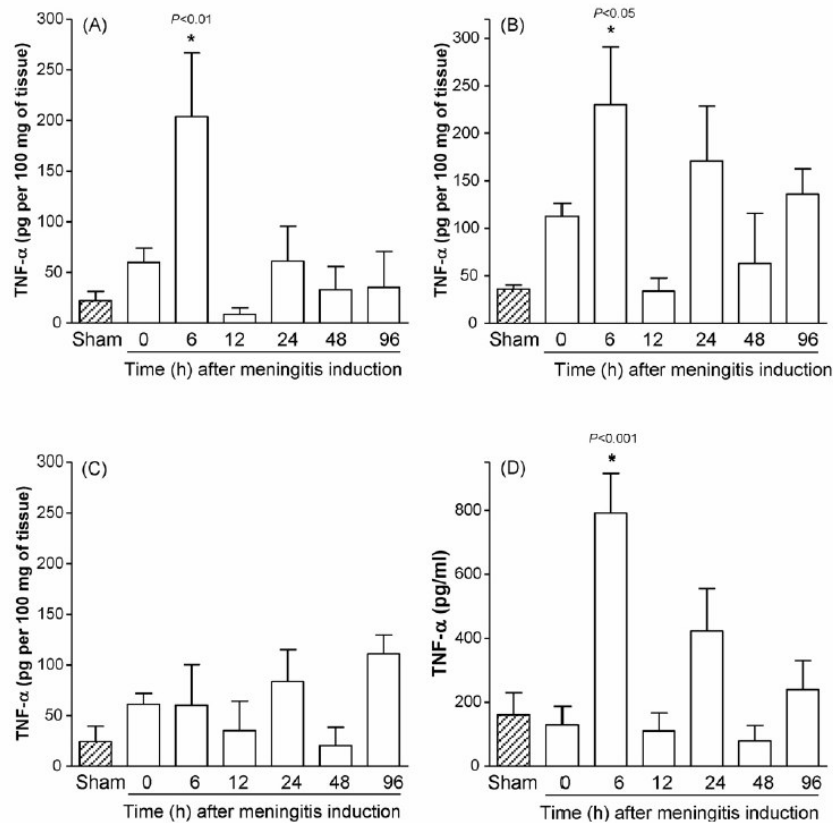
Meningitis is an inflammation of the meninges, the membranes covering the brain and spinal cord, and is characterized by clinical symptoms of headache, fever and meningism [16]. The annual incidence, among adults, of bacterial meningitis (three to six cases per 100,000 persons) [3], common causes of bacterial meningitis in the United States and Northern Europe include *Streptococcus pneumoniae* (47–51% of cases), *Neisseria meningitidis* (25–37%), and *Listeria monocytogenes* (4–8%) [11]. *S. pneumoniae* is a major cause of severe infections such as meningitis, septicemia and pneumonia worldwide [6]. Pneumococcal meningitis is consistently associated with a particularly high incidence of neurologic sequ-

lae, with up to half of the survivors presenting some form of neurological deficits [12], and it is believed that is acquired via colonization of the nasopharynx, followed by bacteremia and invasion of the blood–brain barrier partly through interactions between cell–wall phosphorylcholine and platelet-activating-factor receptor [15]. Physiologically, concentrations of leukocytes, antibodies, and complement components in the subarachnoid space are low, and this condition facilitates the multiplication of bacteria [26]. The presence of proliferating bacteria within the subarachnoid and ventricular space compartments triggers an intense inflammatory host response at killing the invading microorganism. Proinflammatory mediators released in the process include tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 [28], and matrix metalloproteinases [18], and all of which have been shown to contribute to the development of brain injury in bacterial meningitis [28,18,19]. TNF- $\alpha$  is a major proinflammatory cytokine released from several cell types, and can be synthesized in the central ner-

\* Corresponding author at: Laboratório de Fisiopatologia Experimental, PPGCS, UNASAU, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil. Fax: +55 48 3443 4817.

E-mail address: [tba@unesoc.net](mailto:tba@unesoc.net) (T. Barichello).





**Fig. 1.** Kinetics of TNF $\alpha$  expression after induction of Meningitis. The concentrations of TNF $\alpha$  in (A) hippocampus, (B) frontal cortex, (C) cortex and (D) cerebrospinal fluid 0, 6, 12, 24, 48 and 96 h after meningitis induction was assessed by ELISA and results are shown as pg of TNF- $\alpha$  per 100 mg of tissue or pg/ml. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. of 4–5 animals in each group. (\*) Symbols indicate statistically significant when compared with Sham.

vous system (CNS) by microglia, astrocytes, and some populations of neurons after brain injury [20,24]. TNF- $\alpha$  has several effects, including cytotoxicity, antiviral activity, transcription factor activation, and immune response regulation [2]. TNF- $\alpha$  exerts its effects by binding to specific receptors named TNF-R1 and TNF-R2 [7]. TNF-R1 is more abundantly expressed, existing in most tissues and cell types and appears to be the main signaling receptor. The majority of deleterious effects produced by TNF- $\alpha$  seems to be mediated via this receptor. TNF-R1 mediates many actions of TNF- $\alpha$ , including cytokine production, activation of transcription factors like NF- $\kappa$ B, apoptosis and necrosis [2,25]. Elevated levels of TNF- $\alpha$  have been associated with the pathological effects of a variety of infectious, neurological, neurodegenerative, and neurotoxic conditions [23]. Therefore, the aim of this study is to evaluate the levels of TNF- $\alpha$  in the brain and cerebrospinal fluid (CSF) after meningitis induced by *S. pneumoniae* in adults Wistar rats.

Male Wistar rats (250–300 g body weight) from our breeding colony were used for the experiments. All procedures were approved by the Animal Care and Experimentation Committee of the UNESC, Brazil, and followed in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised in 1996.

All surgical procedures and bacterial inoculations were performed under anesthesia, consisting of an intraperitoneal administration of ketamine (6.6 mg/kg), xylazine (0.3 mg/kg), and acepromazine (0.16 mg/kg) [12,8,9,1]. *S. pneumoniae* (serotype 3) was cultured overnight in 10 mL of Todd Hewitt broth, diluted in

fresh medium and grown to logarithmic phase. The culture was centrifuged for 10 min at (5000  $\times$  g) and re-suspended in sterile saline to the concentration  $5 \times 10^9$  cfu/mL. The accuracy of the inoculum size was confirmed by quantitative cultures [8,9,14]. Rats underwent a cisterna magna tap with a 23-gauge needle. The animals received either 10  $\mu$ L of sterile saline as a placebo or an equivalent volume of *S. pneumoniae* suspension. At the time of inoculation, animals received fluid replacement (10 mL of saline subcutaneously) and were subsequently returned to their cages [14,13]. Following their recovery from anesthesia, animals were supplied with food and water *ad libitum*. Animals were killed by decapitation at different times from meningitis induction: 0, 6, 12, 24, 48 and 96 h. Meningitis was documented by a quantitative culture of 5  $\mu$ L of CSF obtained by puncture of the cisterna magna immediately before decapitation. The mortality in the sham group was 16.6% and 47.3% in the meningitis group. The brain structures hippocampus, cortex and frontal cortex, and CSF were immediately isolated on dry ice and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for analyses of the TNF- $\alpha$  levels.

The concentration of TNF- $\alpha$  was measured in hippocampus, frontal cortex, cortex and cerebrospinal fluid using commercially available ELISA assays, following the instructions supplied by the manufacturer (DuoSet kits, R&D Systems; Minneapolis).

The results were showed by mean  $\pm$  S.E.M. of 4–5 animals in each group. Difference among groups was evaluated by using analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls post hoc test. *p* Value <0.05 was considered statistically significant.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)